

DOCKET NO.: 263270US0PCT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Stephane MIRAS, et al.
SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION
FILED: HERewith
INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/FR03/01877
INTERNATIONAL FILING DATE: June 19, 2003
FOR: PLASTID-TARGETING PEPTIDE

REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION

Commissioner for Patents
Alexandria, Virginia 22313

Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicant claims as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NO</u>	<u>DAY/MONTH/YEAR</u>
France	02 07729	21 June 2002

Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the International Bureau in PCT Application No. PCT/FR03/01877. Receipt of the certified copy(s) by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

Respectfully submitted,
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon
Attorney of Record
Registration No. 24,618
Surinder Sachar
Registration No. 34,423
Corwin P. Umbach, Ph.D.
Registration No. 40,211

Customer Number

22850

(703) 413-3000
Fax No. (703) 413-2220
(OSMMN 08/03)

TIFR 03 / 01877
10/517309

REC'D 01 SEP 2003

WIPO PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 24 JUIN 2003

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr

Best Available Copy



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2

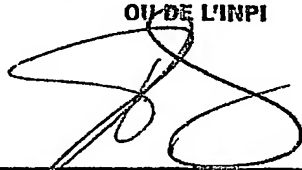


Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 540 6 W / 010501

REMISE DES PIÈCES DATE 21 JUIN 2002 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI 21 JUIN 2002 Vos références pour ce dossier (facultatif) MJPbv1516/7		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE CABINET ORES 6, avenue de Messine 75008 PARIS	
Confirmation d'un dépôt par télécopie <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie			
2 NATURE DE LA DEMANDE Demande de brevet <input checked="" type="checkbox"/> Demande de certificat d'utilité <input type="checkbox"/> Demande divisionnaire <input type="checkbox"/> Demande de brevet initiale N° _____ Date _____ ou demande de certificat d'utilité initiale N° _____ Date _____ Transformation d'une demande de brevet européen <input type="checkbox"/> Demande de brevet initiale N° _____ Date _____		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) PEPTIDE D'ADRESSAGE PLASTIDIAL.			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases) Nom ou dénomination sociale _____ Prénoms _____ Forme juridique _____ N° SIREN _____ Code APE-NAF _____ Domicile ou siège Rue _____ Code postal et ville _____ Pays _____ Nationalité _____ N° de téléphone (facultatif) _____ Adresse électronique (facultatif) _____		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique GENOPLANTE-VALOR Société par actions simplifiées _____ _____ 93, rue Henri Rochefort 93 1 0 2 5 EVRY CEDEX FRANCE _____ N° de télécopie (facultatif) _____ <input type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	

Remplir impérativement la 2^{ème} page

REMISE DES PIÈCES DATE 21 JUIN 2002 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT 0207729 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI
Vos références pour ce dossier : <i>(facultatif)</i>		MJPbv1516/7
6 MANDATAIRE <i>(s'il y a lieu)</i> Nom Prénom Cabinet ou Société N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		VIALLE-PRESLES Marie José CABINET ORES
Adresse	Rue	6, avenue de Messine
	Code postal et ville	75 008 PARIS
	Pays	FRANCE
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>		01.45.62.75.00
N° de télécopie <i>(facultatif)</i>		01.45.62.04.86
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>		ores@cabinet-ores.com
7 INVENTEUR (S) Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)
8 RAPPORT DE RECHERCHE Établissement immédiat ou établissement différé		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation) <input checked="" type="checkbox"/> Établissement immédiat <input type="checkbox"/> Établissement différé
Paiement échelonné de la redevance <i>(en deux versements)</i>		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention <i>(joindre un avis de non-imposition)</i> <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention <i>(joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG</i>
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		
10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Paris, le 21 juin 2002 VIALLE-PRESLES Marie José (n° 93-2009)		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI 

La présente invention est relative à la production de protéines d'intérêt dans des végétaux, et notamment à leur adressage vers le compartiment plastidial.

Les plastes sont des organites intracellulaires des végétaux chlorophylliens (algues, mousses, et végétaux supérieurs). On distingue plusieurs types principaux de plastes, selon leur teneur en pigments, et la nature de ceux-ci : les amyloplast, riches en amidon, les chloroplastes dans lesquels les pigments principaux sont les chlorophylles, et les chromoplastes dont les pigments principaux sont des caroténoïdes. Ces trois catégories de plastes qui dérivent de précurseurs communs, les proplast, ont une structure de base commune constituée par une double membrane emprisonnant le stroma plastidial. Dans les chloroplastes, il existe un troisième système membranaire formant à l'intérieur du stroma des saccules dénommées thylakoïdes.

Outre leur rôle primordial dans la photosynthèse, les chloroplastes sont également impliqués dans des réactions d'oxydoréduction, par exemple la réduction des nitrites en ammonium. Les plastes jouent également un rôle essentiel dans la biosynthèse et/ou le stockage de nombreuses molécules, parmi lesquelles on citera l'amidon, les lipides, les caroténoïdes, la plupart des acides aminés, des hormones végétales (acide abscissique, précurseurs des gibbérellines, du jasmonate, etc.).

Bien que les plastes possèdent leur propre génome codant pour une partie de leurs protéines, une grande partie des enzymes intervenant dans les différentes fonctions plastidiales sont codées par le génome nucléaire et importées dans les plastes.

Cette importation s'effectue par un mécanisme spécifique, qui a plus particulièrement été étudié dans le cas des chloroplastes (pour revue cf. CHEN et SCHNELL, Trends Cell Biol. 9, 222-227, 1999 ; KEEGSTRA et CLINE, The Plant Cell 11, 557-570, 1999 ; SCHLEIFF et SOLL, Planta 211, 449-456, 2000 ; JACKSON-CONSTAN et KEEGSTRA, Plant Physiol. 125, 1567-1676, 2001). Ce mécanisme fait intervenir un système d'import dans chacune des deux membranes plastidiales : dans

la membrane externe, le complexe TOC (Translocon at Outer membrane of Chloroplast) qui comprend au moins trois protéines : Toc 86, 75 et 34 (KESSLER et al., Science 266, 1035-1039, 1994 ; PERRY et KEEGSTRA, Plant Cell 6, 93-105, 1994) ; dans la membrane interne, le complexe TIC (Translocon at Inner membrane of Chloroplast) qui comprend au moins quatre protéines : Tic 110, 55, 22 et 20 (KESSLER et BLOBEL, Proc. Natl. Acad. Sci. 93, 7684-7689, 1996 ; LÜBECK et al., EMBO J. 15, 4230-4238, 1996 ; CALIEBE et al., EMBO J. 16, 7342-7350, 1997 ; KOURANOV et al., J. Cell Biol., 143, 991-1002, 1998), ainsi qu'une protéine chaperonne dans le stroma : ClpC (AKITA et al., J. Cell Biol. 136, 983-994, 1997 ; NIELSEN et al., EMBO J. 16, 935-946, 1997).

Un élément majeur de ce mécanisme est Toc75, qui est la protéine la plus abondante dans la membrane externe, et forme le pore central du canal de translocation situé dans cette membrane (SCHNELL et al., Science 266, 1007-1012, 1994 ; TRANEL et al., EMBO J. 14, 2436-2446, 1995). Toc75 interagit spécifiquement avec une séquence particulière, dénommée « peptide d'adressage » ou « peptide de transit », localisée à l'extrémité N-terminale des protéines importées dans les plastes (MA et al., J. Cell Biol. 134, 315-327, 1996).

De nombreux peptides d'adressage ont été identifiés dans les précurseurs des protéines adressées vers l'espace intermembranaire, la membrane interne, le stroma, et dans le cas des chloroplastes, vers la membrane du thylakoïde.

Parmi les protéines connues pour posséder un peptide d'adressage intraplastidial clivable, on citera notamment des protéines adressées à l'espace intermembranaire, (Tic22: KOURANOV et al., 1998, précédemment cité; KOURANOV et al., J. Biol. Chem. 274, 25181-25194, 1999), des protéines adressées à la membrane interne (TPT(Triose-Pi/Pi translocator) : BRINK et al., J. Biol. Chem. 270, 20808-20815, 1995), des protéines adressées au stroma (petite sous-unité de la ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase (Rubisco) : DE CASTRO SILVA FILHO et al., Plant

Mol. Biol. 30, 769-780, 1996; *anhydrase carbonique*), des protéines adressées à la membrane du thylakoïde (LHCP(light harvesting complex) : LAMPPA et al., J. Biol. Chem. 263, 14996-14999, 1988; *Cfo-II: ATPase subunit*) et à la lumière du
 5 thylakoïde (OEE1(Oxygen Evolving Element 1) : KO et CASHMORE, EMBO J. 8, 3187-3194, 1989).

Ces peptides d'adressage comprennent généralement entre 40 et 100 acides aminés, et possèdent pour la plupart d'entre eux, des caractéristiques communes : ils sont
 10 quasiment dépourvus d'acides aminés chargés négativement, tels que l'acide aspartique, l'acide glutamique, l'asparagine ou la glutamine ; leur région N-terminale est dépourvue d'acides aminés chargés, et d'acides aminés tels que la glycine ou la proline ; leur région centrale contient une
 15 proportion très élevée d'acides aminés basiques ou hydroxylés, tels que la sérine et la thréonine ; leur région C-terminale est riche en arginine et a la capacité de former une structure secondaire amphipathique, en feuillet bêta.

Dans le cas des protéines adressées vers la
 20 lumière du thylakoïde, le peptide d'adressage est bipartite et comprend des informations additionnelles pour traverser la membrane du thylakoïde (DE BOER et WEISBEEK, Biochim. Biophys. Acta. 1071, 221-253, 1991). Dans certains cas, ce peptide d'adressage bipartite peut aussi être retrouvé chez
 25 des protéines adressées vers la membrane du thylakoïde (KARNAUCHOV et al., J. Biol. Chem. 269, 32871-32878, 1994).

Dans tous les cas le peptide d'adressage est clivé après l'importation. Ce clivage est effectué par des protéases spécifiques; une protéase localisée dans le
 30 stroma (VANDERVERE et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 92, 7177-7181, 1995), et une protéase localisée dans la lumière du thylakoïde (CHAAL et al., J. Biol. Chem. 273, 689-692, 1998) ont été décrites.

Les protéines adressées à la membrane externe ne
 35 comportent généralement pas de peptide signal clivable ; l'information d'adressage est contenue dans la protéine mature (CLINE et HENRY, Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 12, 1-26, 1996) ; après leur synthèse dans le cytosol, ces protéines

sont directement incorporées dans la membrane (VAN'T HOF et al, FEBS lett. 291, 350-354, 1991 et J. Biol. Chem. 268, 4037-4042, 1993 ; PINADUWAGE et BRUCE, J. Biol. Chem. 271, 32907-32915, 1996) par l'intermédiaire d'interactions, dont la nature demeure mal connue, avec la bicouche lipidique. La seule exception connue à ce jour concerne la protéine Toc75 ou (OEP75) dont l'adressage à la membrane externe nécessite la présence d'un peptide d'adressage N-terminal bipartite clivable (TRANDEL et al., 1995, précédemment cité; TRANDEL and KEEGSTRA, Plant Cell 8, 2093-2104, 1996).

Il est connu que l'utilisation des peptides d'adressage aux plastides est nécessaire pour introduire dans ceux-ci des protéines d'intérêt permettant d'agir sur diverses fonctions plastidiales notamment dans le but d'améliorer les caractéristiques de plantes d'intérêt agronomique, par exemple la biosynthèse des lipides, de l'amidon, des vitamines, des hormones ou des protéines par lesdites plantes, ou leur résistance aux maladies aux insectes ou aux herbicides. Par exemple, la Demande EP 189707 propose l'utilisation de peptides d'adressage clivables issus de précurseurs de protéines chloroplastiques, et en particulier du peptide d'adressage de la petite sous-unité de la ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, pour importer une protéine d'intérêt dans des chloroplastes ; la Demande PCT WO 00/12732 propose l'utilisation de peptides d'adressage de différentes protéines plastidiales pour importer des protéines d'intérêt dans des plastides.

Les fonctions plastidiales pouvant être modifiées de la sorte, et les caractéristiques conférées par ces modifications sont très diverses.

A des fins d'illustration non-limitative, on peut citer :

- l'augmentation de la résistance aux herbicides, par expression du précurseur de l'acétolactate synthétase (ALS), (LEE et al. EMBO J., 7, 1241-1248, 1988) d'acétolactate synthétase mutée (PRESTON et POWLES, Heredity 88, 8-13, 2002) ; CHONG et CHOI, Biochem. Biophys. Res. Commun. 279, 462-467, 2000), ou de la 3-énolpyruvylshikimate-

5-phosphate synthétase (EPSP synthétase) (KLEE et al., Mol. Gen. Genet., 210, 437-442, 1987)

- l'augmentation de la résistance à différents stress, par expression de la zéaxanthine époxidase, (SEO et al., Trends Plant Sci., 7, 41-48, 2002), de la choline monooxygénase (SHEN et al., Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao, 17, 1-6, 2001), du produit du gène ERD1_ARATH (KIYOSUE et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 15, 196, 1214-1220, 1993), de la ferrochélatase (CHOW et al., J. Biol. Chem., 31, 272, 27565-27571, 1997), de l'omega-3 acide gras désaturase (IBA et al., Tanpakushitsu Kakusan Koso, 39, 2803-2813, 1994; MURAKAMI et al., Science 21, 287(5452), 476-479, 2000), de la glutamine synthétase (FUENTES et al., J. Exp. Bot., 52, 1071-1081, 2001)
- la modification du métabolisme des plastes, pour augmenter la capture d'énergie lumineuse, (GAUBIER et al., Mol. Gen. Genet., 1, 249, 58-64, 1995), les capacités de photosynthèse et de croissance, (MIYAGAWA et al., Nature Biotech., 19, 965-969, 2001), la teneur en caroténoïdes (HUGUENEY et al., Eur. J. Biochem., 1, 209, 399-407, 1992 ; MANN et al., Nature Biotech., 18, 888-892, 2000), ou la teneur en différentes substances d'intérêt, telles que l'amidon (Demande PCT WO 00/11144), des acides aminés essentiels (MUEHLBAUER et al., Plant Physiol., 106, 1303-1312, 1994), la provitamine A (RÖMER et al., Nature Biotech., 18, 666-669, 2000), des hormones (JOYARD et al., Plant Physiol. 118, 715-723, 1998), etc.

- la surexpression et l'adressage chloroplastique de protéines utilisables à des fins de bioremédiation (détoxification ou dépollution des sols contaminés) telles que la ferritine, (LOBREAUX et al., Biochem. J., 15, 288(Pt 3), 931-939, 1992), les protéines de la famille des phytochélatines (CAZALE et CLEMENS, FEBS 507, 215-219, 2001 ; TSUJI et al., BBRC 293, 653-659, 2002), etc.

- Tous les peptides d'adressage intraplastidial connus dans l'art antérieur permettent d'importer une protéine dans les plastes par l'intermédiaire des systèmes membranaires d'import TOC et TIC, comme indiqué ci-dessus. Il

a été constaté que l'utilisation de ces peptides pour l'adressage de protéines d'intérêt dans le chloroplaste pouvait, notamment dans les cas où la construction peptide d'adressage/protéine d'intérêt est placée sous contrôle d'un promoteur fort tel que le promoteur 35S, présenter l'inconvénient de saturer ces systèmes d'import, en entrant en compétition avec les protéines adressées naturellement au chloroplaste. Il en résulte des « fuites » se traduisant au bout de quelques jours par la présence de la protéine d'intérêt dans d'autres compartiments subcellulaires comme le cytoplasme.

Il serait souhaitable de disposer de peptides d'adressage intraplastidial, qui ne dépendraient pas du système d'import TOC/TIC, et permettraient donc d'éviter les inconvénients mentionnés ci-dessus.

Lors de travaux précédents visant à identifier, par une approche protéomique, des protéines de préparations de membranes de chloroplastes d'épinard, les Inventeurs ont identifié, entre autres, des peptides possédant une similitude de séquence importante avec une protéine putative de 41 kDa d'*Arabidopsis* (numéro d'accès TrEMBL Q9SV68) (SEIGNEURIN-BERNY et al., Plant. J. 19, 217-228, 1999; FERRO et al., Electrophoresis 21, 3517-3526, 2000).

En poursuivant leurs travaux afin de mieux caractériser la protéine d'*Arabidopsis*, et son homologue chez l'épinard, les Inventeurs ont constaté que, de manière surprenante, bien qu'il s'agisse de protéines synthétisées dans le cytoplasme et importées au niveau de la membrane interne du chloroplaste, leur importation s'effectuait sans clivage d'un peptide d'adressage ; en outre, l'analyse de séquences de ces protéines ne fait apparaître aucune séquence possédant les caractéristiques des peptides d'adressage plastidial connus.

Les protéines de la famille représentée par la protéine de 41 kDa d'*Arabidopsis*, et la protéine homologue d'épinard sont désignées ci-après sous la dénomination IE41 (IE pour Inner Envelope selon la nomenclature classiquement utilisée pour ce système membranaire).

La séquence de la protéine IE41 d'*Arabidopsis* est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO:1 ; la séquence de l'ADNc codant pour la protéine IE41 d'épinard est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO:2, et la séquence polypeptidique correspondante est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO:3.

Les Inventeurs ont recherché quelles étaient les régions des protéines IE41 impliquées dans leur adressage plastidial, et ont identifié une région de 41 acides aminés (résidus 60 à 100) essentielle à cet adressage.

La séquence de cette région est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO: 4 pour la protéine IE41 d'*Arabidopsis*, et sous le numéro SEQ ID NO: 5 pour la protéine IE41 d'épinard.

Ils ont en outre constaté que lorsque des fragments d'IE41 contenant cette région étaient fusionnés à l'extrémité N-terminale d'une protéine hétérologue, la protéine recombinante résultant de cette fusion était adressée aux chloroplastes de manière similaire à la protéine IE41 entière.

La présente invention a pour objet un polypeptide d'adressage intraplastidial caractérisé en ce qu'il comprend :

- un domaine A constitué par un polypeptide présentant au moins 60%, de préférence au moins 70%, avantageusement au moins 80%, et de manière tout à fait préférée au moins 90% d'identité, ou au moins 65%, de préférence au moins 75%, avantageusement au moins 85%, et de manière tout à fait préférée au moins 95% de similarité, avec l'un des polypeptides SEQ ID NO: 4 ou SEQ ID NO: 5 ;

et au moins un domaine choisi parmi :

- un domaine B situé à l'extrémité N-terminale du domaine A, et constitué par un fragment de l'un des polypeptides SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 3 comprenant au moins les acides aminés 49 à 59, de préférence au moins les acides aminés 39 à 59, avantageusement au moins les acides aminés 29 à 59, de manière tout à fait préférée au moins les

acides aminés 19 à 59, et de manière particulièrement avantageuse au moins les acides aminés 9 à 59 dudit polypeptide, ou bien par un polypeptide présentant au moins 60%, de préférence au moins 70%, avantageusement au moins 80%, et de manière tout à fait préférée au moins 90% d'identité, ou au moins 65%, de préférence au moins 75%, avantageusement au moins 85%, et de manière tout à fait préférée au moins 95% de similarité, avec ledit fragment ;

- un domaine C situé à l'extrémité C-terminale du domaine A, et constitué par un fragment de l'un des polypeptides SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 3 comprenant au moins les acides aminés 101 à 111, de préférence au moins les acides aminés 101 à 121, avantageusement au moins les acides aminés 101 à 131, de manière tout à fait préférée au moins les acides aminés 101 à 141, et de manière particulièrement avantageuse au moins les acides aminés 101 à 151 dudit polypeptide, ou bien par un polypeptide présentant au moins 60%, de préférence au moins 70%, avantageusement au moins 80%, et de manière tout à fait préférée au moins 90% d'identité, ou au moins 65%, de préférence au moins 75%, avantageusement au moins 85%, et de manière tout à fait préférée au moins 95% de similarité, avec ledit fragment.

Les pourcentages d'identité ou de similarité mentionnés ici sont déterminés à l'aide du logiciel BLASTp (ALTSCHUL et al., Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402, 1997), en utilisant les paramètres par défaut.

Les domaines A, B, et/ou C définis ci-dessus peuvent provenir d'une même protéine IE41 ; ils peuvent également provenir de protéines IE41 d'origines différentes.

La présente invention a également pour objet tout polypeptide chimérique résultant de la fusion d'un polypeptide d'adressage intraplastidial conforme à l'invention avec un polypeptide hétérologue. Ledit polypeptide hétérologue peut être n'importe quel polypeptide d'intérêt que l'on souhaite introduire dans les plastes. De préférence, le polypeptide d'adressage intraplastidial conforme à l'invention est placé à l'extrémité N-terminale du peptide hétérologue. Il pourrait toutefois être également

placé à l'intérieur de celui-ci, ou bien à son extrémité C-terminale.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un polypeptide d'adressage intra-plastidial conforme à l'invention pour l'importation d'une protéine d'intérêt dans des plastes, et avantageusement, pour l'adressage de ladite protéine à la membrane interne plastidiale.

Selon un mode de mise en œuvre préféré de la présente invention, ledit polypeptide d'adressage intra-plastidial est utilisé pour l'importation de ladite protéine d'intérêt dans des chloroplastes.

En particulier, la présente invention a pour objet un procédé pour importer une protéine d'intérêt dans des plastes caractérisé en ce qu'il comprend l'expression, dans une cellule végétale contenant lesdits plastes, d'un polypeptide chimérique résultant de la fusion d'un polypeptide d'adressage intraplastidial conforme à l'invention avec un polypeptide hétérologue.

La présente invention a également pour objet :

- tout polynucléotide codant pour un polypeptide d'adressage intraplastidial ou pour un polypeptide chimérique conforme à l'invention ;

- toute cassette d'expression recombinante comprenant un polynucléotide conforme à l'invention placé sous contrôle de séquences appropriées de régulation de la transcription (notamment promoteur et terminateur de transcription).

- tout vecteur recombinant résultant de l'insertion, dans un vecteur-hôte approprié, d'un polynucléotide ou d'une cassette d'expression conforme à l'invention.

La présente invention a aussi pour objet des cellules-hôtes hébergeant un polynucléotide, une cassette d'expression, ou un vecteur recombinant conforme à l'invention.

La présente invention englobe également des plantes transgéniques génétiquement transformées par un

polynucléotide ou une cassette d'expression conforme à l'invention, ainsi que les descendants de ces plantes. L'invention comprend également les cellules et tissus végétaux, ainsi que les organes ou parties de plantes, y
5 compris feuilles, tiges, racines, fleurs, fruits, et/ou graines obtenues à partir de ces plantes.

Les techniques classiques de construction de vecteurs recombinants, de transformation de cellules ou d'organismes hôte, et de production de protéines
10 recombinantes, sont utilisables pour la mise en œuvre de la présente invention.

Le choix du vecteur-hôte, et des séquences de régulation de l'expression seront effectuées notamment en fonction de la méthode de transformation et de la plante hôte
15 choisies, et/ou du type de cellule ou de tissu dans lequel on souhaite obtenir l'expression.

De très nombreux promoteurs utilisables pour l'expression dans des cellules végétales sont connus en eux-mêmes. A titre d'exemples, on peut choisir un promoteur
20 constitutif, tel que le promoteur 35S du CaMV ou ses dérivés, ou le promoteur de l'actine ou de l'ubiquitine, etc. On peut également choisir un promoteur inductible ou bien un promoteur tissu-spécifique, afin de n'effectuer l'adressage plastidial de la protéine d'intérêt qu'à certains stades du
25 développement de la plante, dans certaines conditions environnementales, ou dans certains tissus-cibles.

Par exemple, si l'on souhaite obtenir préférentiellement un adressage de la protéine d'intérêt vers les chloroplastes, on exprimera un polypeptide chimérique
30 conforme à l'invention sous contrôle d'un promoteur spécifique de tissus ou organes riches en plastes. A titre d'exemples, les promoteurs du virus de la Chlorelle régulant l'expression du gène de l'adénine méthyltransférase (MITRA et HIGGINS, Plant Mol. Biol. 26, 85-93, 1994) ou celui du virus
35 de la mosaïque du manioc (VERDAGUER et al., Plant Mol. Biol. 37, 1055-1067, 1998) s'expriment principalement dans les tissus verts. Les éléments régulateurs du promoteur du gène 2A11 de la tomate permettent une expression spécifique dans

les fruits (VAN HAAREN et HOUCK, Plant Mol. Biol. 17, 615-630, 1991), etc.

Des méthodes de transformation de cellules végétales ou de plantes entières sont bien connues en elles-mêmes : à titre d'exemples non-limitatifs, on citera la transformation de protoplastes en présence de polyéthylèneglycol, l'électroporation, l'utilisation d'un canon à particules, la micro-injection cytoplasmique ou nucléaire, ou la transformation par l'intermédiaire d'*Agrobacterium*.

La présente invention peut être mise en œuvre dans les applications usuelles des peptides d'adressage aux plastides, et notamment dans celles mentionnées plus haut, pour agir sur diverses fonctions plastidiales. Il s'agit, en particulier, de la modification de fonctions propres à la membrane interne de l'enveloppe, par exemple, les biosynthèses de pigments, de quinones, d'acides gras, de vitamines et de précurseurs d'hormones végétales, mais aussi, l'import de tous les ions et métabolites vers le plaste.

Les caractéristiques des peptides d'adressage plastidial conformes à l'invention, qui sont très différentes de celles des peptides d'adressage plastidial connus permettent de supposer que les peptides d'adressage conformes à l'invention utilisent un système d'import différent de celui impliquant les protéines TOC et TIC.

De ce fait, les protéines d'intérêt adressées aux plastides à l'aide d'un peptide d'adressage conforme à l'invention n'entreraient pas en compétition avec les protéines naturellement adressées vers le plaste par l'intermédiaire du système TOC et TIC, et ne satureraient pas ce dernier. Ceci permettrait notamment d'éviter les fuites dans les autres compartiments subcellulaires, et de conserver les protéines d'intérêt dans le chloroplaste, même après plusieurs jours d'expression. Ceci permettrait également d'adresser vers les plastides des protéines pour lesquelles l'import classique grâce à une séquence d'adressage clivable en N-terminal et utilisant le système TIC/TOC, ne serait pas fonctionnel.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples non-limitatifs illustrant l'obtention et la caractérisation de peptides d'adressage plastidial conformes à l'invention et leur mise en œuvre pour l'importation de protéines hétérologues dans les chloroplastes.

EXEMPLE 1 : CARACTERISATION ET CLONAGE DE LA PROTEINE IE41 D'ARABIDOPSIS THALIANA

Lors de travaux antérieurs visant à identifier les protéines les plus hydrophobes de préparations de membranes chloroplastiques d'épinard (SEIGNEURIN-BERNY et al., Plant. J., 19, p.217-228, 1999 ; FERRO et al., Electrophoresis, 21, 3517-3526, 2000), plusieurs peptides dérivant d'une protéine de 41, kDa présentant une forte similarité de séquence avec une protéine putative d'*Arabidopsis* (Numéro d'accèsion TrEMBL Q9SV68) ont été mis en évidence.

Cependant, l'analyse de la séquence primaire de cette protéine de 41 kDa à l'aide du programme TMPred (HOFMANN et STOFFEL, Biol. Chem. Hoppe-Seyler., 347, 166, 1993), n'a pas permis de détecter de segments transmembranaires pouvant assurer l'ancrage de la protéine dans une bicouche lipidique.

Pour confirmer la localisation de cette protéine dans l'enveloppe du chloroplaste, l'ADNc correspondant a été cloné et la protéine recombinante sur-exprimée chez *E. coli* afin d'obtenir des anticorps polyclonaux dirigés contre cette protéine.

Expression chez *E. coli*

L'ADNc codant pour la protéine de 41 kDa d'*Arabidopsis* est obtenu par PCR, à partir d'une librairie d'ADNc d'*Arabidopsis*, en utilisant les amorces suivantes :

TCACATATGGCTGGAAACTCAATGCAC (SEQ ID NO : 10)

qui permet d'introduire un site de restriction *NdeI* (souligné) à l'extrémité 5' de l'ADNc ;

ATGGATCCAACGCTCTTATGGCTCGAC (SEQ ID NO : 11)

qui permet d'introduire un site de restriction *Bam*HI (souligné) à l'extrémité 3' de l'ADNc.

Le fragment d'amplification est cloné dans le plasmide pBluescript KS⁻. L'insert est ensuite digéré par les enzymes de restriction *Nde*I et *Bam*HI, et inséré dans le vecteur d'expression pET-15b (NOVAGEN).

Le vecteur résultant permet l'expression d'une protéine recombinante ayant une extension polyhistidine (His-tag) à son extrémité N-terminale [(His-tag)-P41].

Ce vecteur est utilisé pour transformer des bactéries *E. coli*, souche BLR(DE3).

Les bactéries recombinantes sont mises en culture dans 500 ml de milieu LB contenant 100 µg/ml d'ampicilline à 37°C. Quand la densité optique à 600 nm (DO₆₀₀) de la culture d'*E. coli* atteint 0,6, on ajoute de l'IPTG (isopropyl-β-D-galactothiopyranoside) à une concentration finale de 1 mM, pour induire l'expression de la protéine de 41 kDa.

Après 3 heures de culture, les cellules sont centrifugées pendant 2 mn à 13 000 rpm (EPPENDORF 5415D).

Le culot est remis en suspension dans 20 ml de tampon de lyse (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM Na Cl, 10 mM imidazole, pH 8) et les bactéries sont lysées par sonication (sonicateur OMRON, type STP.YM.220.VAC, 6x1 mn, 0°C).

Après sonication, l'extrait protéique total est analysé par SDS-PAGE 12%. Les gels sont colorés au bleu de Coomassie (R-250, BIORAD).

Les résultats sont illustrés par la figure 1A :
Légende de la figure 1A :

pET-15b = bactéries transformées par le plasmide non recombinant (contrôle négatif)

pET-15b + insert = bactéries transformées par le plasmide recombinant

- = pas d'induction par IPTG

+ = induction par IPTG

* = bande correspondant à la protéine de 41 kDa recombinante

Après induction par l'IPTG, la protéine recombinante est fortement exprimée dans les bactéries

transformées par le plasmide pET-15b comprenant l'insert d'ADNc d'*Arabidopsis*.

Solubilisation de la protéine recombinante

Le culot bactérien est mis en suspension dans
5 1 ml de tampon Tris/HCl 20 mM, pH 6,8 puis lysé par sonication (sonicateur OMRON, type STP.YM.220.VAC, 6x1 mn, 0°C).

Après sonication, une première centrifugation (2 mn, 13 000 rpm) de l'extrait protéique total permet
10 d'isoler les protéines solubles du surnageant. Les protéines insolubles du culot sont mises en suspension dans 1 ml d'un tampon contenant du détergent (20 mM Tris/HCl pH 6,8, 0,5% Triton X-100). Une seconde centrifugation permet d'isoler les protéines membranaires solubilisées par le Triton X-100. Les
15 protéines non solubilisées sont remises en suspension dans 20 mM Tris/HCl, pH 6,8 et analysées. Les différentes fractions sont analysées par SDS-PAGE 12%, comme indiqué ci-dessus.

Les résultats sont illustrés par la figure 1B :

20 Légende de la figure 1B :

pET-15b = bactéries transformées par le plasmide non recombinant (contrôle négatif)

pET-15b + insert = bactéries transformées par le plasmide recombinant

25 S = protéines solubles

D = protéines solubilisées dans le Triton X-100

I = protéines non solubilisées dans le Triton X-100

* = bande correspondant à la protéine de 41 kDa recombinante

On note que la protéine recombinante (*) se
30 retrouve dans 2 fractions distinctes : une fraction hydrosoluble présente dans le cytosol d'*E. coli* et une fraction insoluble, qui n'est pas solubilisée par le Triton X-100, ce qui indique qu'elle est probablement agrégée sous forme de corps d'inclusion.

35 Purification de la protéine recombinante

La fraction soluble de la protéine (His.tag)-P41 recombinante est purifiée par chromatographie d'affinité.

Après centrifugation (10 mn à 6 000 rpm, EPPENDORF 5415D), le surnageant est déposé sur une colonne d'affinité « His-bind resin », (NOVAGEN) de 2,5 ml chargée avec 13 ml de tampon de charge (50 mM NiSO₄) et équilibrée par 5 ml de tampon d'équilibrage (20 mM Tris/HCl pH 7,9, 5 mM imidazole, 0,5 M NaCl).

La colonne est lavée avec 2 volumes contenant 35 mM imidazole, et 2 volumes de tampon de lyse contenant 60 mM imidazole (L2). La protéine est éluée avec 6 volumes de tampon de lyse contenant 250 mM imidazole. Les différentes fractions sont analysées par SDS-PAGE 12% et révélées au bleu de Coomassie.

Les résultats sont illustrés par la figure 2.

Légende de la figure 2 :

- C = culot bactérien dilué dans le tampon de lyse (10 µl)
- S = protéines bactériennes solubles (10 µl)
- P = protéines non fixées (10 µl)
- L, L1, L2 = lavages avec le tampon de lyse (35 et 60 mM imidazole) (15 µl)
- Elution = fraction éluée en présence de 250 mM imidazole.

Production d'anticorps polyclonaux

La protéine recombinante (His-tag)-P41 purifiée, est dessalée (colonne SEPHADEX G25) et stockée à -80°C.

Cette protéine recombinante est utilisée pour immuniser des lapins afin de produire des anticorps polyclonaux dirigés contre la protéine de 41 kDa d'*Arabidopsis*.

EXEMPLE 2 : LOCALISATION DE LA PROTEINE DE 41 KDA DANS LES CHLOROPLASTES

Lors de la procédure de purification, la protéine de 41 kDa se comporte comme une protéine hydrosoluble et faiblement hydrophobe, ce qui pose la question de son association effective avec l'enveloppe du chloroplaste.

Sa localisation sub-cellulaire a donc été vérifiée par analyse de différentes fractions chloroplastiques.

Des chloroplastes bruts sont obtenus à partir de 3-4 kg de feuilles d'épinard (*Spinacia oleracea* L.) et sont

purifiés par centrifugation isopycnique sur gradient de Percoll (DOUCE et JOYARD, Methods in chloroplast Molecular Biology. Edelman, M., Hallick, R. and Chua, N.-H., eds. (Amsterdam : Elsevier Science Publishers BV), 239-256, 1982).

5 A ce stade, des inhibiteurs de protéases (1 mM PMSF, 1 mM benzamidine et 0,5 mM acide amino caproïque) sont ajoutés afin d'empêcher toute dégradation protéique. Les chloroplastes purifiés sont lysés dans un milieu hypotonique, et les membranes de l'enveloppe sont purifiées à partir du
10 lysat par centrifugation sur gradient de sucrose (DOUCE ET JOYARD, 1982, précité). Des sous-fractions d'enveloppe respectivement enrichies en membranes externes et internes sont obtenues selon le protocole décrit par BLOCK et al. (J. Biol. Chem., 258, 13273-13280, 1983).

15 Toutes les étapes ci-dessus sont réalisées entre 0 et 5°C. Les fractions obtenues sont stockées en azote liquide dans 50 mM MOPS-NaOH, pH 7,8, en présence d'inhibiteurs de protéases (1 mM benzamidine et 0,5 mM acide amino caproïque).

20 Analyse des fractions chloroplastiques

Les analyses par SDS-PAGE des chloroplastes totaux, ou de leurs fractions membranes d'enveloppe, stroma, membranes des thylakoïdes ; 15 µg) ainsi que des sous-fractions d'enveloppe de chloroplastes (15 µg) sont
25 effectuées comme décrit par CHUA (Methods Enzymol., 69, 434-436, 1980). Les gels de résolution et de concentration (12-15% acrylamide), comme le tampon de migration, contiennent 0,1% de SDS. Les peptides sont révélés soit par le bleu de Coomassie (MANIATIS et al., Cold Spring Harbor Laboratory,
30 Cold Spring Harbor, NY, 1982) soit par le nitrate d'argent (MERRIL et al., Anal. Biochem., 110, 201-207, 1981).

Pour les analyses par Western blot, la protéine de 41 kDa est détectée en utilisant les anticorps polyclonaux dirigés contre la protéine recombinante d'*Arabidopsis*
35 produite comme décrit à l'exemple 1, marqués à la phosphatase alcaline.

Les résultats sont représentés sur la figure 3A.

Légende de la figure 3A :

C = protéines du chloroplaste
 E = protéines des membranes d'enveloppe
 S = protéines du stroma
 T = protéines des membranes des thylakoïdes

5 Ces résultats montrent que la protéine de 41 kDa est associée uniquement avec l'enveloppe du chloroplaste et n'est pas détectée dans le stroma ni dans les thylakoïdes.

Les chloroplastes intacts purifiés sont dépourvus de protéines du cytosol qui peuvent contaminer la préparation
 10 (DOUCE et JOYARD, 1980, précité). Toutefois, la protéine de 41 kDa pourrait interagir spécifiquement avec la membrane externe de l'enveloppe du chloroplaste et pourrait ainsi être co-purifiée avec les préparations d'enveloppe. Afin d'exclure cette possibilité, 20 µg d'enveloppe issue de chloroplastes
 15 intacts sont traités avec la thermolysine de *Bacillus thermoproteolyticus* (0, 20, 50 et 100 µg/ml) afin de digérer les polypeptides localisés sur la face externe de la membrane externe de l'enveloppe (JOYARD et al., J. Biol. Chem., 258, 10000-10006, 1983). A titre de contrôle, des protéines
 20 d'enveloppe solubilisées subissent le même traitement protéolytique.

La présence de la protéine de 41 kDa est détectée par Western blot, comme décrit ci-dessus.

Les résultats sont représentés dans les figures
 25 3B et 3C.

Légende des figures 3B et 3C :

0 = absence de thermolysine
 20 = thermolysine à 20 µg/ml
 50 = thermolysine à 50 µg/ml
 30 100 = thermolysine à 100 µg/ml

La protéine de 41 kDa n'est pas affectée par le traitement par la thermolysine (figure 3B), alors que le même traitement protéolytique réalisé sur des protéines d'enveloppe solubilisées montrent la sensibilité de la
 35 protéine de 41 kDa au traitement par la thermolysine (figure 3C). Ce résultat exclut l'hypothèse selon laquelle la protéine de 41 kDa serait localisée sur la face externe de la membrane externe. De fait, la protéine de 41 kDa n'est pas

une protéine du cytosol contaminant les préparations d'enveloppe de chloroplaste.

Des sous-fractions d'enveloppe respectivement enrichies en membranes externes et internes sont utilisées pour préciser la sous-localisation de la protéine de 41 kDa au niveau de la membrane de l'enveloppe du chloroplaste. La nature de ces sous-fractions d'enveloppe a été confirmée par l'utilisation des marqueurs IE18 et OEP24, qui sont respectivement des protéines intrinsèques de la membrane interne et externe de l'enveloppe du chloroplaste. Les protéines IE18 et OEP24 sont détectées en utilisant des anticorps polyclonaux dirigés spécifiquement contre chacune de ces protéines.

Les résultats sont représentés dans la figure 3D.

Légende de la figure 3D :

E = protéines des membranes de l'enveloppe

OM = protéines de la membrane externe

IM = protéines de la membrane interne

La protéine de 41 kDa se retrouve, comme la protéine IE18, uniquement dans les préparations d'enveloppes chloroplastiques enrichies en membrane interne.

L'ensemble des résultats représentés dans les figures 3A-3D montre que la protéine de 41 kDa est localisée au niveau de la membrane interne de l'enveloppe du chloroplaste.

D'après la nomenclature classique, cette protéine de l'enveloppe interne, présentant une masse théorique en électrophorèse sur gel de polyacrylamide, de 41 kDa, est dénommée IE41 (pour « Inner Envelope Protein of 41 kDa »).

Analyse des interactions entre la protéine IE41 et la membrane interne de l'enveloppe du chloroplaste

Pour analyser plus précisément le mode d'interaction de la protéine IE41 avec la membrane interne des chloroplastes, différentes hypothèses ont été testées :

1) La protéine IE41 serait une protéine soluble localisée dans l'espace intermembranaire situé entre les membranes externe et interne de l'enveloppe du chloroplaste. Cette protéine serait co-purifiée avec les préparations

d'enveloppe, et séquestrée dans les vésicules d'enveloppe. Dans ce cas la sonication des vésicules d'enveloppe permettrait la libération de IE41.

Pour tester cette première hypothèse, des
 5 protéines d'enveloppe (500 µg) sont solubilisées dans 50 mM
 MOPS, pH 7,8 (500 µl). Les vésicules d'enveloppe sont
 soniquées pendant 10 sec puis centrifugées (20 mn à 72 000 g,
 Beckman L2 65B, rotor SW28) afin de séparer les protéines
 solubles et membranaires. Chaque fraction (20 µl) est
 10 analysée par SDS-PAGE 12% (révélation : bleu de Coomassie) et
 Western blot.

Les résultats sont représentés dans la figure 4A.
 Légende de la figure 4A :

- = pas de sonication
 15 + = sonication
 S = protéines solubles
 I = protéines de membrane

Les analyses par SDS-PAGE et Western blot des
 fractions d'enveloppe traitées montrent que la protéine IE41
 20 n'est pas solubilisée après sonication des vésicules
 d'enveloppe. Au contraire, les protéines majeures solubles du
 stroma (RbcL) qui sont séquestrées dans les vésicules
 d'enveloppe, et qui sont connues pour contaminer les
 fractions d'enveloppe, sont solubilisées par ce traitement.
 25 Ceci montre que la protéine IE41 n'est ni une protéine
 soluble de l'espace intermembranaire, ni une protéine soluble
 du stroma contaminant la fraction d'enveloppe purifiée.

2) La protéine IE41 peut être liée à la membrane
 interne :

30 - par ancrage à la bicouche lipidique ou
 insertion partielle dans celle-ci ; dans ce cas, seule
 l'utilisation de détergent peut permettre la solubilisation
 de la protéine IE41 ;

- par des interactions électrostatiques avec une
 35 ou plusieurs protéines membranaires ou la surface polaire de
 la bicouche lipidique dans ce cas, ces interactions peuvent
 être rompues, et la protéine IE41 solubilisée, par un
 traitement alcalin ou par de fortes concentrations salines.

Pour déterminer le type d'interactions impliquées dans la liaison de IE41 avec la membrane interne, les expérimentations suivantes ont été effectuées :

a) solubilisation par le Triton X-100 :

5 Des vésicules d'enveloppe (0,8 mg) sont diluées dans 1 ml de 50 mM MOPS, pH 7,8 contenant 0,05, 0,1 ou 0,2% (v/v) de Triton X-100. Après incubation pendant 30 mn à 4°C, le mélange est centrifugé pour séparer les protéines solubles et membranaires. Toutes les fractions (20 µl) sont analysées
10 par SDS-PAGE 12% (révélation : bleu de Coomassie) et Western blot.

Les résultats sont illustrés par la figure 4C.

Légende de la figure 4C :

Mix = vésicules d'enveloppe purifiées

15 M = protéines membranaires d'enveloppe

S = protéines solubles d'enveloppe

Ces résultats montrent que la protéine IE41 peut être totalement solubilisée par des concentrations de Triton X-100 (0,2%), beaucoup plus faibles que celles (de l'ordre de
20 2%) qui sont nécessaires pour solubiliser les protéines intrinsèques.

b) solubilisation par traitement alcalin ou par traitement salin.

25 Des vésicules d'enveloppe purifiées (500 µg) sont incubées 30 mn à 4°C dans différents milieux (500 µl) :

1) 10 mM MOPS, pH 7,8 + 0,5 M NaCl ;

2) 10 mM MOPS, pH 7,8 + 0,5 M KI ;

3) 0,1 M Na₂CO₃, pH 11 ;

4) 0,1 N NaOH,

30 puis soniquées et centrifugées comme décrit ci-dessus afin de séparer les protéines solubles et membranaires.

Toutes les fractions sont analysées (20 µl) par SDS-PAGE 12% (révélation : bleu de Coomassie) et Western blot
35 (détection avec les anticorps polyclonaux dirigés contre la protéine IE41 d'*Arabidopsis* (dilution 1/5 000) ou dirigés contre la protéine IE18 (dilution 1/5 000)).

Les résultats sont représentés dans la figure 4B

Légende de la figure 4B :

+ = sonication (10 sec)

NaCl 0,5 M = traitement 1

KI 0,5 M = traitement 2

5 0,1 M Na₂CO₃, pH 11 = traitement 3

0,1 N NaOH = traitement 4

S = fraction de protéines solubles

I = fraction de protéines insolubles

10 Ces résultats montrent que la protéine IE41 est au moins en partie solubilisée par les traitements salins (KI, NaCl) ou alcalins modérés (Na₂CO₃), qui sont sans effet sur la protéine intrinsèque IE18, cette dernière ne pouvant être solubilisée que par un traitement alcalin fort (NaOH).

15 L'ensemble des résultats présentés dans les figures 4A, 4B et 4C indiquent que la protéine IE41 est une protéine extrinsèque dont la liaison à la membrane interne de l'enveloppe chloroplastique implique des interactions électrostatiques.

20 **EXEMPLE 3 : PURIFICATION ET CARACTERISATION DE LA PROTEINE IE41 D'EPINARD**

De façon surprenante, la protéine IE41 purifiée à partir de chloroplastes d'épinard et la protéine recombinante d'*Arabidopsis* présentent une taille similaire en SDS-PAGE et Western blot, ce qui évoque la possibilité que IE41 puisse 25 être adressée à la membrane interne de l'enveloppe sans nécessiter le clivage d'une séquence d'import N-terminale.

Pour tester cette hypothèse, la protéine IE41 présente dans l'enveloppe des chloroplastes d'épinards a été purifiée afin de la séquencer et de comparer sa séquence à 30 celle de l'ADNc correspondant.

Immunopurification de la protéine IE41 d'épinard

Des protéines d'enveloppe chloroplastique (1 mg) sont solubilisées dans 1 ml de tampon Tris/HCl 50 mM, NaCl 150 mM, CHAPS 6 mM et centrifugées (20 mn, 72 000 g, Beckman 35 L2 65B, rotor SW28). Les protéines solubles sont incubées pendant 1 h à 4°C avec 33 µl de sérum polyclonal dirigé contre la protéine recombinante IE41 d'*Arabidopsis*. On ajoute alors 50 µg d'agarose-protéine A (BOEHRINGER) et le mélange

est incubé 3 h à 4°C. Après 3 lavages successifs par centrifugation (EPPENDORF 5415D, 12 000 rpm, 20 mn, 4°C) et remise en suspension du culot dans 1 ml de tampon de solubilisation (20 mM MOPS, 150 mM NaCl, 6 mM CHAPS, pH 7,8), on ajoute un excès (50 µg) de protéine recombinante (His-tag)-IE41 dans 200 µl de tampon de solubilisation. Le mélange est incubé pendant 1 h à 4°C, et centrifugé pendant 20 mn à 12 000 rpm (EPPENDORF 5415D). Le surnageant est incubé pendant 1 h avec de la résine Ni-NTA (QIAGEN), précédemment équilibrée dans le tampon de solubilisation, afin d'éliminer la majeure partie de la protéine recombinante (His-tag)-IE41.

Chaque fraction (20 µl) est analysée par SDS-PAGE 12% (révélation au nitrate d'argent) et Western blot (en utilisant les anticorps polyclonaux de lapin anti-IE41 décrits à l'Exemple 1).

Les résultats sont représentés dans la figure 5.

Légende de la figure 5 :

A : analyse par SDS-PAGE ;

B : Western blot ;

Mix = protéines d'enveloppe solubilisées ;

C = protéines insolubles ;

S = protéine solubles ;

L1, L2, L3 = fractions récupérées au cours des 3 lavages successifs ;

E1 = fraction éliminée par incubation avec la résine Ni-NTA;

E2 = protéine IE41 d'épinard purifiée (So) + (His-tag)-IE41.

La fraction E2 comprenant la protéine IE41 naturelle d'épinard purifiée (So) demeure contaminée par la protéine (His-tag)-IE41 recombinante d'*Arabidopsis*.

La différence de taille entre ces deux protéines correspond à l'extension polyhistidine (His-tag) présente à l'extrémité N-terminale de la protéine recombinante.

EXEMPLE 4 : OBTENTION DE L'ADNc CODANT POUR LA PROTEINE IE41 D'EPINARD.

Le séquençage partiel de la protéine IE41 d'épinard élue à partir du gel d'électrophorèse a permis d'obtenir 9 séquences peptidiques différentes. Ces séquences

ont été utilisées pour définir des amorces dégénérées qui ont permis d'isoler l'ADNc codant pour la protéine IE41.

La séquence complète de cet ADNc (SEQ ID NO: 2), ainsi que la séquence polypeptidique déduite (SEQ ID NO:3) sont représentées sur la figure 6. Le codon ATG d'initiation de la traduction est indiqué en caractères gras, et le codon stop TAA est souligné. Les 9 séquences peptidiques obtenues par séquençage direct de la protéine IE41 d'épinard sont surlignées en gris. La correspondance entre les peptides obtenus avec la séquence déduite de l'ADNc de la protéine IE41 d'épinard, en particulier au niveau de la région N-terminale, ainsi que la présence d'un codon stop en aval de la méthionine initiatrice et dans le même cadre de lecture, démontrent que l'ADNc prédit est complet et que cette protéine ne subit pas de maturation post-traductionnelle lors de son adressage à la membrane interne de l'enveloppe du chloroplaste

La protéine IE41 d'épinard présente 75,1% d'identité et 88,8% de similarité avec la protéine IE41 d'*Arabidopsis*. Cette forte similarité, et le fait qu'*Arabidopsis* contient seulement un gène *ie41* par génome haploïde, permettent de conclure que ces protéines sont codées par des gènes d'*Arabidopsis* et d'épinard orthologues.

Les protéines IE41 d'*Arabidopsis* et d'épinard ont été alignées avec des protéines homologues de bactérie, de levure, et d'animaux.

Les résultats sont présentés sur la figure 7.

Arabidopsis thaliana : IE41 ATH (SEQ ID NO : 1),

Epinard : IE41 SOL (SEQ ID NO : 3) ;

protéines homologues :

Escherichia coli : QORECOLI (SEQ ID NO : 6),

Saccharomyces cerevisiae : QORYEAST (SEQ ID NO : 7),

Cavia Porcellus : QORCAVPO (SEQ ID NO : 8),

souris : QORMOUSE (SEQ ID NO : 9).

Les résidus conservés dans les 6 séquences peptidiques sont surlignés en gris foncé. Les résidus conservés dans la séquence de IE41 et dans au moins une autre séquence de protéine homologue sont surlignés en gris clair.. Les

similarités entre résidus se basent sur les groupes suivants : ASPTG, ILMV, KRH, NQ, DE, YWF et C.

Les recherches d'homologies indiquent que la protéine IE41 appartient à la superfamille des deshydrogénases, et plus particulièrement au groupe des quinones oxydo-réductases de type ξ -crystalline (JÖRNVALL et al., FEBS 3, 240-244, 1993). De plus, la comparaison de séquence entre les protéines IE41 et les autres protéines de la même famille, révèle que les 50 premiers résidus dans la région N-terminale de ces protéines sont très conservés entre bactéries, végétaux, et animaux. Cette observation suggère que cette région N-terminale des protéines IE41 de végétaux ne serait pas impliquée dans l'adressage dans le chloroplaste, et serait conservée plus probablement du fait de la pression de sélection exercée au cours de l'évolution sur le domaine catalytique de la protéine.

EXEMPLE 5 : ANALYSE DE L'ADRESSAGE PLASTIDIAL DE LA PROTEINE IE41 D'ARABIDOPSIS DANS DES CELLULES D'ARABIDOPSIS ET DE TABAC

Pour définir le domaine essentiel à l'import de la protéine IE41, différentes constructions codant pour des formes tronquées de cette protéine fusionnées à la GFP sont exprimées dans les cellules d'*Arabidopsis* et de tabac.

Construction des vecteurs d'expression :

Le plasmide [35 Ω -sGFP(S65T)] utilisé pour ces constructions, qui comprend la séquence codant pour la GFP sous contrôle du promoteur 35S, ainsi que le plasmide [35 Ω -TP-sGFP(S65T)], qui comprend la séquence codant pour le peptide d'adressage (TP) de la petite sous-unité de la ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, fusionnée à la séquence codant pour la GFP ont été décrits précédemment par CHIU et al. (Curr. Biol., 6, 325-330, 1996).

La séquence codant pour la protéine IE41 d'*Arabidopsis* est amplifiée par PCR en utilisant les deux amorces suivantes :

XhoI-N-ter CCTCTCGAGATGGCTGGAAACTCATGCAC (SEQ ID NO : 12),
et

NcoI-C-ter CAACCCATGGATGGCTCGACAATGATCTTC (SEQ ID NO : 13),

qui introduisent respectivement un site *XhoI* et un site *NcoI* (soulignés).

Le produit de PCR est cloné à bouts francs dans le vecteur PBLUESCRIPT KS (STRATAGENE). Le fragment *XhoI*-*NcoI* clivé du plasmide ainsi obtenu est inséré dans le plasmide 35Ω-sGFP(S65T) préalablement digéré par *Sall*-*NcoI* afin de créer le vecteur 35Ω-IE41-sGFP(S65T), comprenant la région codante de la protéine IE41 d'*Arabidopsis* fusionnée à la GFP. Un protocole similaire est utilisé pour les autres constructions :

*La séquence codant pour la protéine IE41 d'*Arabidopsis* dépourvue des 31 premiers acides aminés est obtenue par amplification PCR en utilisant les deux amorces suivantes :

15 *Sall*-N-ter CGGTTGTCGACATGAAGAGTAATGAGGTTTGCTG (SEQ ID NO : 14)

NcoI-C-ter CAACCCATGGATGGCTCGACAATGATCTTC (SEQ ID NO : 13).

Le plasmide 35Ω-Δ(1-31)IE41-sGFP(S65T) est obtenu par insertion de cette séquence dans le plasmide 35Ω-sGFP(S65T).

*La séquence codant pour la protéine IE41 d'*Arabidopsis* dépourvue des 59 premiers acides aminés est amplifiée par PCR en utilisant les deux amorces suivantes :

25 *Sall*-N-ter GAATGGTCGACATGTTTCTGCCCCGCAAGTTC (SEQ ID NO : 15),
et

NcoI-C-ter CAACCCATGGATGGCTCGACAATGATCTTC (SEQ ID NO : 13).

Le plasmide 35Ω-Δ(1-59)IE41-sGFP(S65T) est obtenu par insertion de cette séquence dans le plasmide 35Ω-sGFP(S65T).

*La séquence codant pour la protéine IE41 d'*Arabidopsis* dépourvue des 99 premiers acides aminés est amplifiée par PCR en utilisant les deux amorces suivantes :

30 *Sall*-N-ter GGTGTCGACATGCTAGGTGGAGGTGGACTTG (SEQ ID NO : 16)

NcoI-C-ter CAACCCATGGATGGCTCGACAATGATCTTC (SEQ ID NO : 13).

35 Le plasmide 35Ω-Δ(1-99)IE41-sGFP(S65T) est obtenu par insertion de cette séquence dans le plasmide 35Ω-sGFP(S65T).

*La séquence codant pour les acides aminés 6-100 de la protéine IE41 d'*Arabidopsis* est amplifiée par PCR en utilisant les deux amorces suivantes :

XhoI-N-ter CCTCTCGAGATGGCTGGAAAACTCATGCAC (SEQ ID NO : 17)

5 *NcoI*-C-ter ACCCATGGCTAGATGGCTAAGAACCGCTAC (SEQ ID NO : 18).

L'amorce SEQ ID NO : 17 comprend un nucléotide supplémentaire par rapport à l'amorce SEQ ID NO : 15, ce qui crée un décalage de la phase de lecture dans le produit d'amplification, dont la traduction débute au niveau du codon
10 ATG correspondant à la méthionine en position 6 de la protéine IE41.

Le plasmide 35 Ω -(6-100)IE41-sGFP(S65T) est obtenu par insertion de cette séquence dans le plasmide 35 Ω -sGFP(S65T).

15 *La séquence codant pour les acides aminés 60-100 de la protéine IE41 d'*Arabidopsis* est amplifiée par PCR en utilisant les deux amorces suivantes :

SalI-N-ter GAATGGTCGACATGTTTCTGCCCCGCAAGTTC (SEQ ID NO : 15)

NcoI-C-ter ACCCATGGCTAGATGGCTAAGAACCGCTAC (SEQ ID NO : 18).

20 Le plasmide 35 Ω -(60-100)IE41-sGFP(S65T) est obtenu par insertion de cette séquence dans le plasmide 35 Ω -sGFP(S65T).

Ces différentes constructions sont représentées sur la figure 8.

Légende de la figure 8 :

25 IE41=plasmide 35 Ω -IE41-sGFP(S65T)

Δ (1-31)IE41= plasmide 35 Ω - Δ (1-31)IE41-sGFP(S65T)

Δ (1-59)IE41= plasmide 35 Ω - Δ (1-59)IE41-sGFP(S65T)

Δ (1-99)IE41= plasmide 35 Ω - Δ (1-99)IE41-sGFP(S65T)

(6-100)IE41= plasmide 35 Ω -(6-100)IE41-sGFP(S65T)

30 (60-100)IE41= plasmide 35 Ω -(60-100)IE41-sGFP(S65T)

Bombardement de cellules d'*Arabidopsis* et de tabac

Les cellules d'*Arabidopsis* sont cultivées à la lumière pendant 3 jours dans du milieu B5 de GAMBORG (SIGMA, pH 5,8) complémenté avec 1,5% sucrose et 1 μ M ANA (acide naphthalène acétique).
35 15 ml de suspension cellulaire (correspondant à environ 0,5 g) sont transférés dans des boîtes de Pétri contenant le même milieu de croissance

additionné de 0,8% bacto-agar, et incubés pendant 18-36 h à la lumière.

Les cellules BY2 de tabac sont cultivées pendant 5 jours à 27°C dans du milieu de MURASHIGE et SKOOG (milieu MS, DUCHEFA, pH 5,8) complété avec 3% sucrose, 0,2% KH₂PO₄, 0,2% myoinositol, 1 µM 2.4D (acide 2.4-dichlorophénoxyacétique) et 3 µM thiamine. 2,5 ml de suspension cellulaire (correspondant à environ 0,3 g) sont transférés dans des boîtes de Pétri contenant le même milieu de croissance additionné de 1% bacto agar et sont placés à 27°C pendant 18-24 h.

Les plasmides comprenant les constructions à tester utilisés pour le bombardement tissulaire sont préparés en utilisant le « QIAfilter Plasmid Midi Kit » (Qiagen, Allemagne).

Le plasmide [35Ω-sGFP(S65T)] (GFP) et le plasmide [35Ω-TP-sGFP(S65T)] (TP-GFP) sont respectivement utilisés à titre de témoin négatif et de témoin positif.

Les plasmides (1 µg) sont introduits dans les cellules en utilisant un canon à particules pneumatique (PDS-1000/He, BIORAD). Les conditions de bombardement sont les suivantes : pression d'hélium de 1 350 psi ; disques de rupture de 1 100 psi (BIORAD) ; distance de cible de 10 cm ; des microporteurs en or de 1 µm (BIORAD) sont utilisés. Après le bombardement, les cellules sont incubées sur ces mêmes boîtes de Petri pendant 18-36 h (à la lumière pour les cellules d'*Arabidopsis*), puis transférées sur des lames en verre avant la microscopie de fluorescence.

Microscopie de fluorescence

La localisation de la GFP et des peptides de fusion à la GFP est analysée dans les cellules transformées par microscopie de fluorescence en utilisant un microscope à fluorescence ZEISS AXIOPLAN 2, et une caméra CCD digitale (HAMAMATSU). Les jeux de filtres utilisés sont : jeu de filtre Zeiss 13, 488013-0000 (excitateur BP 470/20, diviseur de faisceau FT 493, émetteur BP 505-530), et jeu de filtre Zeiss 15, 488015-0000 (excitateur BP 546/12, diviseur de

faisceau FT 580, émetteur LP 590) pour la GFP et l'auto-fluorescence des chlorophylles, respectivement.

Dans ces conditions, la présence de la chlorophylle (spécifiquement localisée au niveau des chloroplastes) et la localisation de la GFP dans la cellule sont visualisées par une fluorescence intense.

Dans les cellules d'*Arabidopsis* transformées avec les constructions GFP, $\Delta(1-99)$ IE41, et (60-100)IE41, la fluorescence de la GFP apparaît diffuse, et localisée au niveau du cytosol et du noyau; aucune co-localisation avec la chlorophylle n'est observée.

Dans les cellules d'*Arabidopsis*, transformées avec les constructions IE41, $\Delta(1-31)$ IE41, $\Delta(1-59)$ IE41, (6-100)IE41, ainsi qu'avec le témoin positif de localisation TP-GFP, on observe au contraire une co-localisation, au niveau des chloroplastes, entre la fluorescence de la GFP et l'autofluorescence de la chlorophylle.

Les résultats sont similaires dans les cellules non chlorophylliennes BY2 de tabac : les marquages fluorescents observés avec les constructions IE41, $\Delta(1-59)$ IE41 et (6-100)IE41, et avec le témoin positif de localisation TP-GFP, correspondent à une localisation plastidiale ; en revanche, les marquages fluorescents observés avec les constructions GFP, $\Delta(1-99)$ IE41, et (60-100)IE41 correspondent à une localisation cytosolique et nucléaire.

Ces expériences montrent que l'adressage est également efficace dans les plastes non chlorophylliens.

L'ensemble des résultats ci-dessus montre que :

- la protéine IE41 complète fusionnée à la GFP est adressée dans le chloroplaste ;

- les 59 résidus localisés en N-terminal ne sont pas essentiels à l'import ;

- les 99 résidus localisés en N-terminal contiennent une région essentielle à l'import ;

- une séquence de 94 résidus, correspondant aux acides aminés N-terminaux 6-100 est suffisante pour catalyser

l'import ; les 223 résidus (101-323) C-terminaux ne sont donc pas essentiels à l'import.

La séquence interne de 40 acides aminés, allant des résidus 60-100, correspond au domaine essentiel à l'import.

- 5 Toutefois, ce domaine qui doit être présent pour diriger la protéine vers les plastes, n'est pas suffisant pour un bon adressage.

REVENDEICATIONS

1) Polypeptide d'adressage intraplastidial caractérisé en ce qu'il comprend :

5 - un domaine A constitué par un polypeptide présentant au moins 60% d'identité, ou au moins 65% de similarité avec l'un des polypeptides SEQ ID NO: 4 ou SEQ ID NO: 5 ;

et au moins un domaine choisi parmi :

10 - un domaine B situé à l'extrémité N-terminale du domaine A, et constitué par un fragment de l'un des polypeptides SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 3 comprenant au moins les acides aminés 49 à 59 dudit polypeptide, ou bien par un polypeptide présentant au moins 60% d'identité, ou au moins 65% de similarité, avec ledit fragment ;

15 - un domaine C situé à l'extrémité C-terminale du domaine A, et constitué par un fragment de l'un des polypeptides SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 3 comprenant au moins les acides aminés 101 à 111 dudit polypeptide, ou bien par un polypeptide présentant au moins 60% d'identité, ou au moins 20 65% de similarité avec ledit fragment.

2) Polypeptide selon la revendication 1, caractérisé en ce que le domaine B est constitué par un fragment comprenant au moins les acides aminés 39 à 59 des polypeptides SEQ ID NO :1 ou SEQ ID NO :3, ou bien par un 25 polypeptide présentant au moins 60% d'identité, ou au moins 65% de similarité, avec ledit fragment.

3) Polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que le domaine C est constitué par un fragment comprenant au moins les acides 30 aminés 101 à 121 des polypeptides SEQ ID NO :1 ou SEQ ID NO :3, ou bien par un polypeptide présentant au moins 60% d'identité, ou au moins 65% de similarité avec ledit fragment.

35 4) Polypeptide chimérique, comprenant un polypeptide d'adressage intraplastidial selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 fusionné avec une protéine hétérologue.

5) Polypeptide chimérique selon la revendication 4, caractérisé en ce que le polypeptide d'adressage intraplastidial est placé à l'extrémité N-terminale de la protéine hétérologue.

5 6) Utilisation d'un polypeptide d'adressage intraplastidial selon la revendication 1 pour l'importation d'une protéine d'intérêt dans des plastes.

10 7) Utilisation selon la revendication 6, caractérisée en ce que ledit polypeptide d'adressage intraplastidial est utilisé pour l'importation de ladite protéine d'intérêt dans des chloroplastes.

15 8) Procédé pour importer une protéine d'intérêt dans des plastes caractérisé en ce qu'il comprend l'expression, dans une cellule végétale contenant lesdits plastes, d'un polypeptide chimérique résultant de la fusion d'un polypeptide d'adressage intraplastidial selon la revendication 1 avec ladite protéine d'intérêt.

9) Polynucléotide codant pour un polypeptide selon une quelconque des revendications 1 à 5.

20 10) Cassette d'expression comprenant un polynucléotide selon la revendication 9 placé sous contrôle de séquences de régulation de la transcription.

25 11) Vecteur recombinant résultant de l'insertion d'un polynucléotide selon la revendication 9 ou d'une cassette d'expression selon la revendication 10, dans un vecteur-hôte.

12) Plante transgénique transformée par un polynucléotide selon la revendication 9 ou d'une cassette d'expression selon la revendication 10.

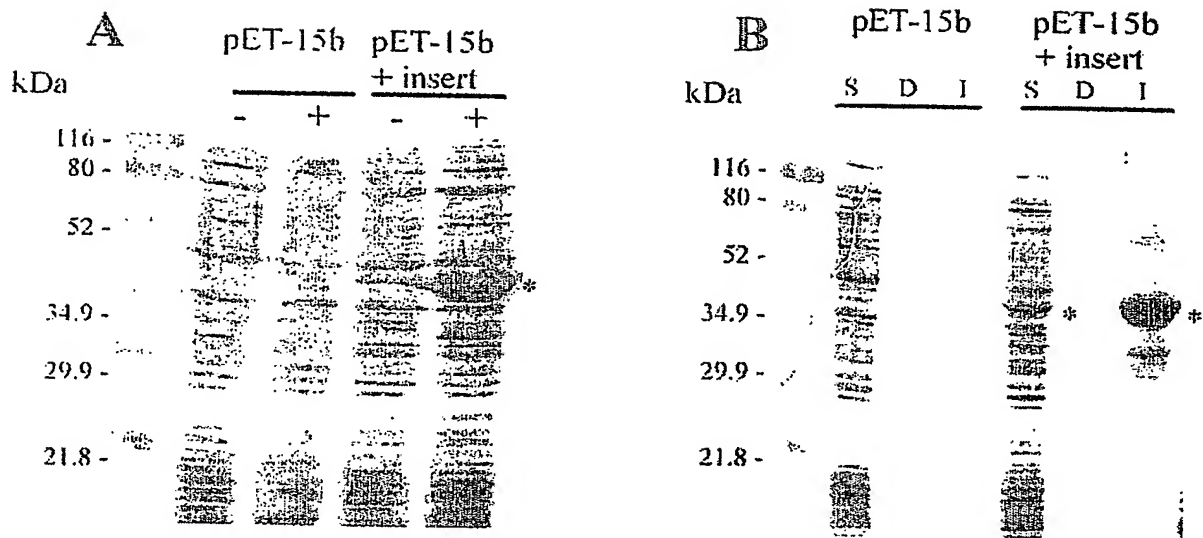


Fig . 1

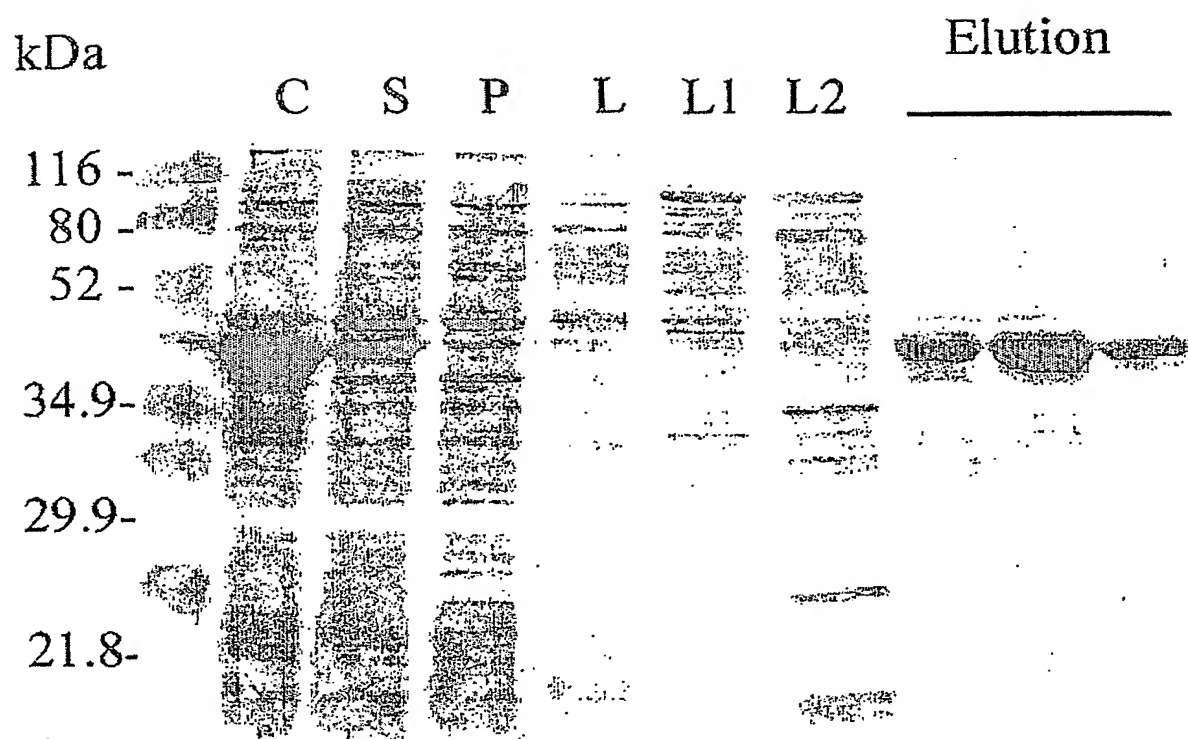


Fig . 2

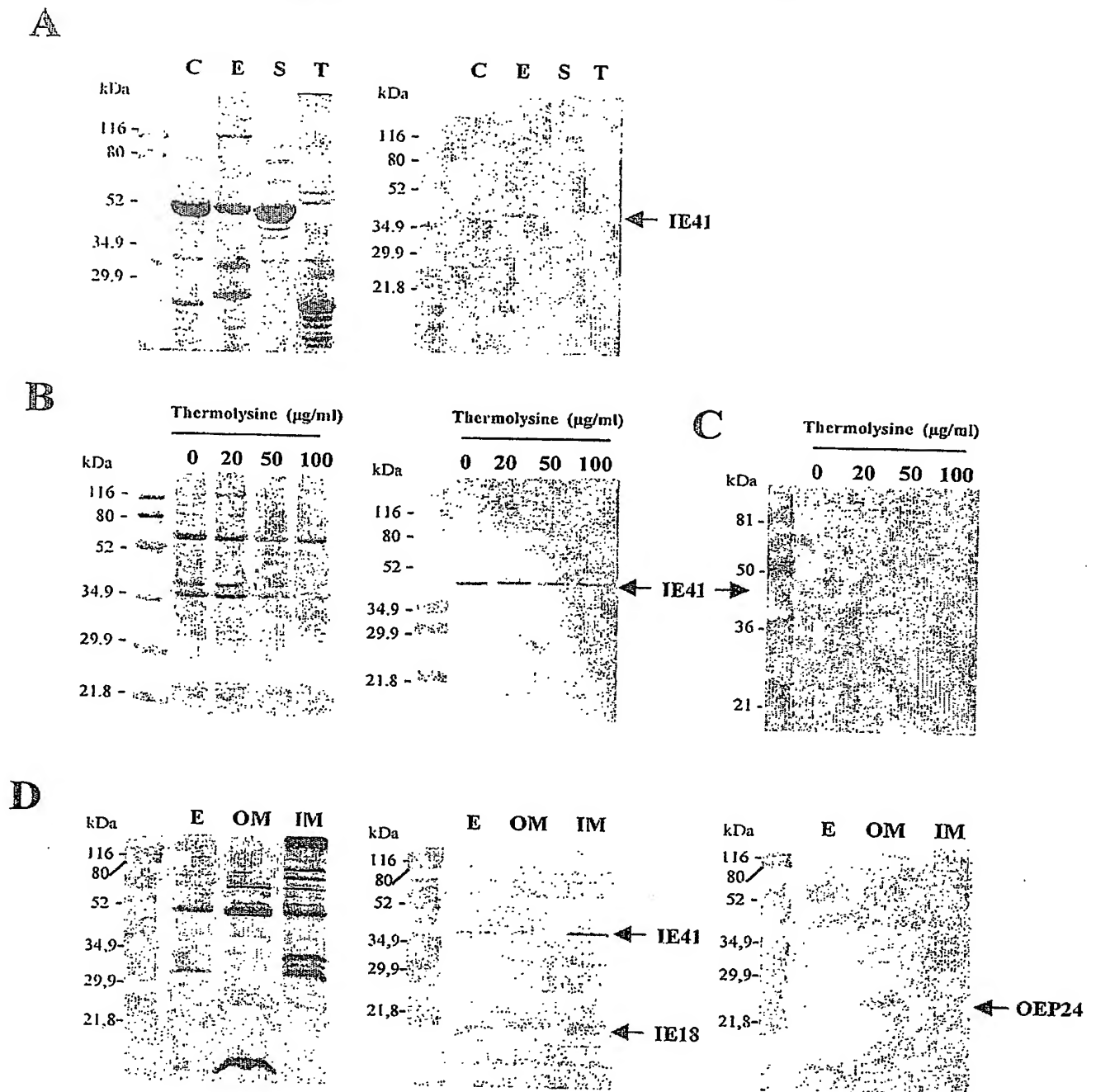
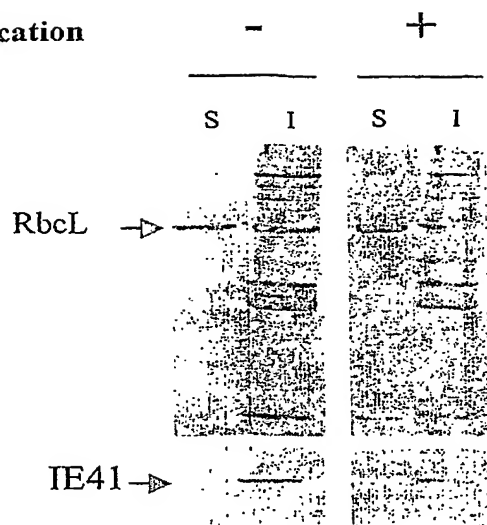


Fig . 3

A

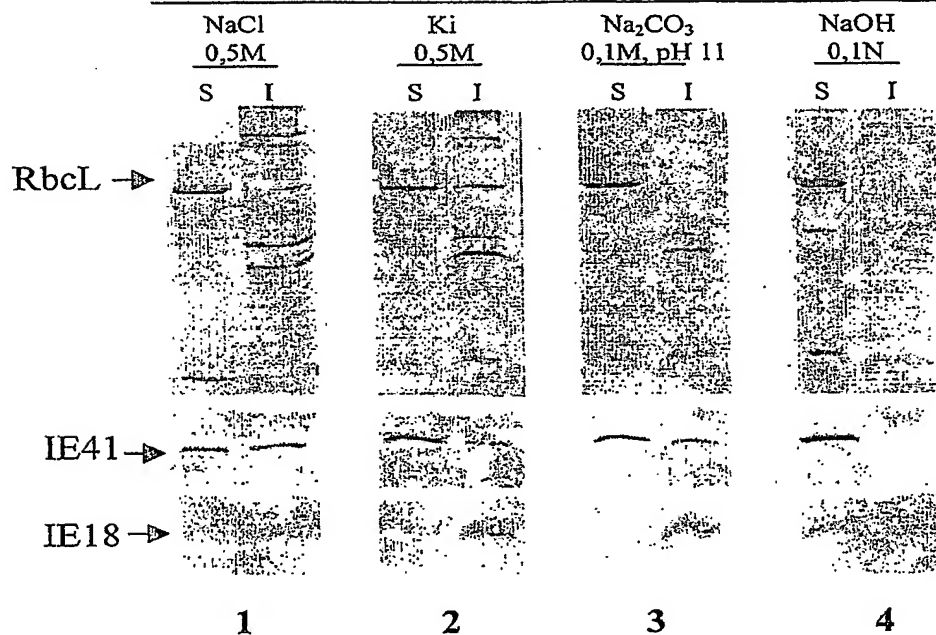
Sonication



B

Sonication

+



C

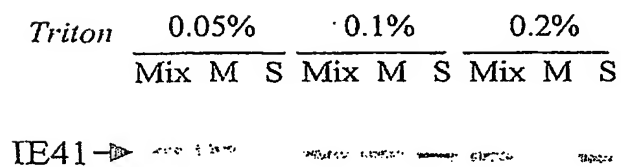


Fig . 4

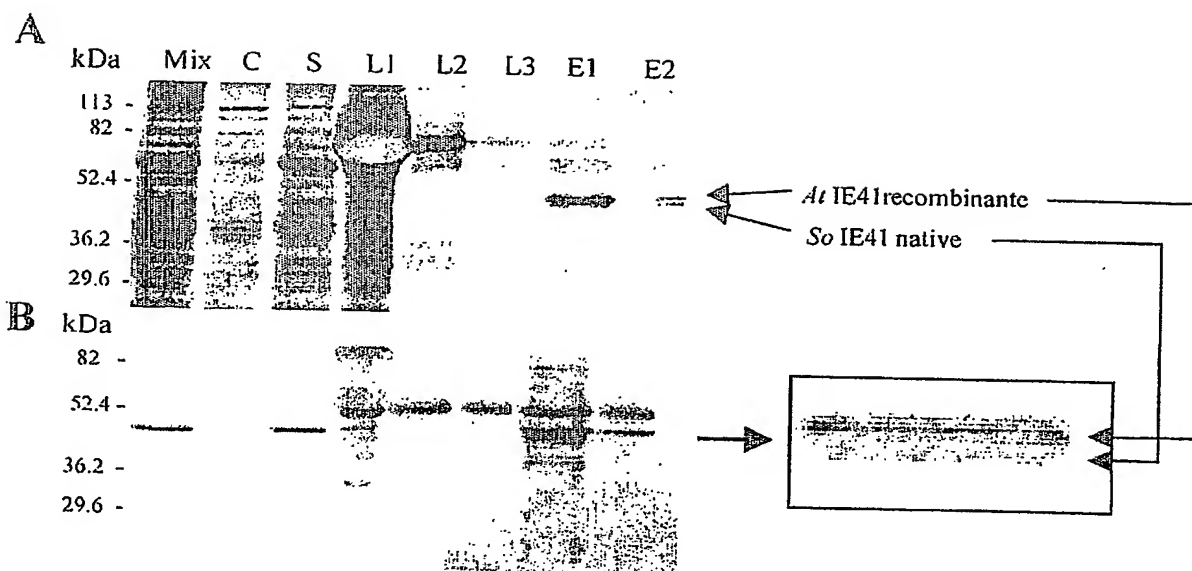


Fig . 5

	ccatcctaata	8
cgactcactatagggctcgagcgccgcccgggcaggtcaaaactgtggtaagataataca		68
gtaccattaccatctgacgcgcaaatggctgctaagctaataatgcattgcgattcaatattct		128
	M A A K L M H A I Q Y S	12
ggctatgggtgggtggaactgatgcttttaaagcatgttgaaagttgctgttcctgatccaaag		188
G V G G G T D A L K H V E V A V P D P K		32
tctgatgagttattgcttaaaattgaggctgcaactttgaacccaattgattggaagatt		248
S D E L L L K I E A A T L N P I D W R I		52
cagaaggggtgacttcgtccctcttaccocgcaagttccctactatacctggaactgat		308
Q K G V L R P L L P R K F P T I P G T D		72
gttgctggggaggttagtcaggctggatctgctgtaaataggtttaaaactggtgacaaa		368
V A G E V V Q A G S A V N R F K T G D K		92
gtcgtggcgtgcttagtcatgctactgggggtgcactagctgaatatgccgtggcgaaag		428
V V A V L S H A T G G A L A E Y A V A K		112
gagaacctgacagttgctagaccaccagaagtatcagcagcagaaggtgctgccttacct		488
E N L T V A R P P E V S A A E G A A L P		132
gttgctgccctcacggctcaccaagctctcaccagtttgccaacatcaagctcgatgga		548
V A A L T A H Q A L T Q F A N I K L D G		152
agtggtgaaaggaagaacatattgatcacggctgcatcaggggtgtggggccactatgcg		608
S G E R K N T L L I T A A S G G V G H M A		172
gtccagctggcaaaagctcggaacacgcataacagcaacatgtggagcccgcaacctta		668
V I O H A K L G N T H V T A T C G A R N L		192
gatttcgtgaaaggcttgggtgcccgatgaggttcttgactacaaaacacctgaagggggcg		728
D F V K G L G A L E V L D Y K T P E C A		212
tccttgacaagcccgtcaggaaagaaatatgactacgtagtcacgggtgcaagcggaatc		788
S L T S P S L G K K Y D Y V V H G A S G I		232
ccttggtccacctttgagcccaatttgagtgaagcaggtgaaggtaatagatttgactcct		848
P W S T F E P N L S E A G K V I D L T P		252
ggcccaactgcaatgatgacatttgcttggaaaaagctaacattctccaaaaagcagctg		908
G P T A M M T F A W K K L T F S K K I O H		272
gtgcctctgcttttgataccaaagatccccaactttgaatatgttgatgaatttggtaaag		968
M P L L L L P P K I P N F E Y V V N L V K		292
gaaaagaagcttaaaacagtcataactctaaacatcccttgagtaaaggtgaagatgct		1028
E K K L K T V I D S K H P L S K G E D A		312
tggagtaggataatgggtgggtcatgctacagggaagattataatcgagccttgaatagaa		1088
W S R I M G G H A T G K I I I E P *		329
aatattgatgcagaccogctatatattgcttgaaggttacaaactttttaagtttatagta		1148
cttgagttatactttcctagttgtaaacattcaagtatttcataatgtttatactttccta		1208
gtttcctccaaaaaaa		1225

Fig . 6

```

QORECOLI  EAT---K---EETHKHGGH-VVQAV-ETTPDHAENETQENKATIEF
QORYEAST  MKCIIPEQOVVLIDEI---Y-VVRYE-TPVRSISEEELITNKYT---Y
QORCAVPO  MARGOIMPAIRVFEEGGE-VVHKVQSDVAVHIEKDHOVLIIVHAC---P
QORMOUSE  MARGOIMPAIRVFEEGGE-VVHKVQSDVAVHIEKDHOVLIIVHAC---P
IE41 ATH  MAG---KMSAQQNSYGGGAGGIEHV-QVEVHTZKSNEVCKLEATSIMP
IE41 SOL  MAA---LMMAQQNSYGGGAGGIEHV-QVAVEDKSEDELLIEAAIMP

QORECOLI  TYIRSEL-YE---EPSLESGLUTAAIISKVSGVKHIAEDRV-Y-ROFAL
QORYEAST  SYFRGI-YE---CEK-EYVLIRAEETWAKGKGVINIEVELQV-AYINNTF
QORCAVPO  TYE-EGTYTRIE-LLTYTPGTEIVGVESINDSAERKGR---FTISLIS
QORMOUSE  TYE-EGGAYSRKG-ALTYTPGSIVAGIIESVQDKSAERKGR---FCYSTVS
IE41 ATH  WKTQKQIRFLRKFCIPATEVIEVEVSCAKNIRAGDVAVLEHLGG
IE41 SOL  WKTQKQVLRALLRKFTTIPETIVGEMVQAGSANNRTGDKVAVLEHGTG

QORECOLI  EAYSSVHNIADKIAILEAIS-FM---QATSTFKGLVYVYLRKIEI---
QORYEAST  EAYSKIE---SQG-PUMKLKGTSDIELKLYAGLQVLTALSTNEVYHV---
QORCAVPO  EAYEYELASDH---YRLIE---KL-FROQALIGPYFTCRATFHARA---
QORMOUSE  EAYEYELASDH---YRLIE---TLN-FROQALIGPYFTCRATFHARA---
IE41 ATH  GGLLEFVATEKLAKRPOEVGAAG---ALPAGLALQATNAGLALD
IE41 SOL  GGLLEFVAKENLVARPHEVSAAG---ALPAAALHQAATOFANILD

QORECOLI  -DE--DEFHAGGVGLICWALGAGGLVVAQKAQSALKAWOV
QORYEAST  -KG--YVLEFAGGVGLILNGLMKGATIVASDEKLKIAKEYTEY
QORCAVPO  -ET-S-VLVHAGGVGLAACATAYGLVLTAAEEGQKVVLONHE
QORMOUSE  -AGE-S-VLVHAGGVGLAACATAYGLVLTAAEEGKKVLONHE
IE41 ATH  GAGKKANILVTASGVGHYVVAALANATACEARN-TEFVKSLADE
IE41 SOL  GAGSRKNLELTASGVGHYVVAALAGNTTATACARN-LDFVKGLEADE

QORECOLI  INYEEDLVERIKEITGG-K-VRVYDSVGRDWTWERSLDCORRELMSEFN
QORYEAST  INASKEDILRQVLKFTNG--GVASFDVSKDTFETSLAAKRVKVFSEFN
QORCAVPO  FNHDAHYIDEKKSIDEX--GVVLEIEMLANVNLNDLKLSCGSRVIVC
QORMOUSE  FNHEANYIDKIMSVDDDKGVVLEIEMLANENLNDLKLSHGRVIVC
IE41 ATH  LDYKTPEGAA-LK-SPGK-K-YEAVHCANGIFFSFEFNSENKVDIIP
IE41 SOL  LDYKTPEGAS-LT-SPGK-K-YEAVVHGAGGIPWSTFEFNLSEACKDLIP

QORECOLI  SSGATGVNLGILNQKGSLYVTRPSLOQYIT-TEELTEASNELFSLASGV
QORYEAST  ASGLTPPFITELNITLVPOLYSYTAD-EWKYISDEFFGLVN-SK
QORCAVPO  CRGSTEIN---DIMESTISGVSEFSS---EEFQOQASTQAGELGW
QORMOUSE  CRGSTEIN---DIMETSIIIGVSLSS---EEFQOQAGLQAGKEGW
IE41 ATH  GPNWWTYVKIITMS---KQVLELLIIPANLE---MAN-LKEGK
IE41 SOL  GPEAMTEWKLDEF---KQVLELLIIPNFEV---VMN-LKEKK

QORECOLI  EVDVAEQQYIKDQRHE-TIEARAQSS---IE
QORYEAST  ELNKKIYKTYPRDYRTAAD-EGRKVGLVLEIPQ
QORCAVPO  KPVIGSQ--YPLEKSOHENIHSQIVKTIILM
QORMOUSE  KPVIGSE--YPLEKAOHEDIHSGKTIIMELL
IE41 ATH  KTVIDS--KHEISKEDWAKSDEHAT-GRIVE-P
IE41 SOL  KTVIDS--KHEISKEDWASRIEGHAT-GRIVE-P

```

Fig . 7

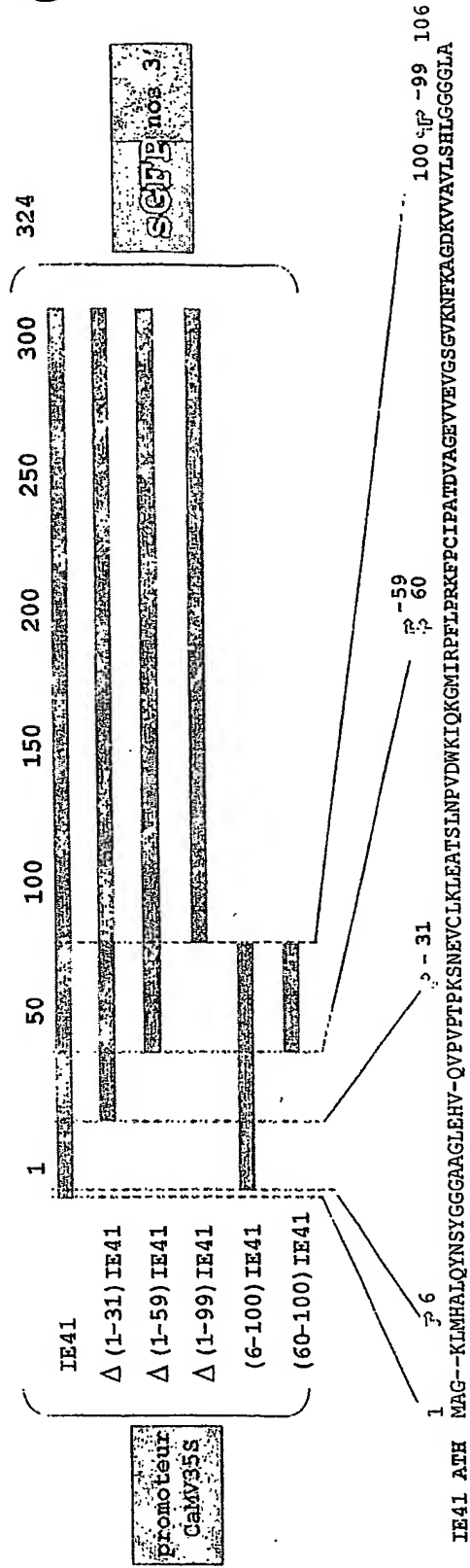


Fig. 8

1516s7.ST25
SEQUENCE LISTING

<110> GENOPLANTE VALOR

<120> PEPTIDE D'ADRESSAGE PLASTIDIAL

<130> MJPbv1516/7

<160> 18

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 329

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

```

Met Ala Gly Lys Leu Met His Ala Leu Gln Tyr Asn Ser Tyr Gly Gly
1      5      10      15
Gly Ala Ala Gly Leu Glu His Val Gln Val Pro Val Pro Thr Pro Lys
20      25      30
Ser Asn Glu Val Cys Leu Lys Leu Glu Ala Thr Ser Leu Asn Pro Val
35      40      45
Asp Trp Lys Ile Gln Lys Gly Met Ile Arg Pro Phe Leu Pro Arg Lys
50      55      60
Phe Pro Cys Ile Pro Ala Thr Asp Val Ala Gly Glu Val Val Glu Val
65      70      75      80
Gly Ser Gly Val Lys Asn Phe Lys Ala Gly Asp Lys Val Val Ala Val
85      90      95
Leu Ser His Leu Gly Gly Gly Gly Leu Ala Glu Phe Ala Val Ala Thr
100     105     110
Glu Lys Leu Thr Val Lys Arg Pro Gln Glu Val Gly Ala Ala Glu Ala
115     120     125

```

1516s7.ST25

Ala Ala Leu Pro Val Ala Gly Leu Thr Ala Leu Gln Ala Leu Thr Asn
130 135 140

Pro Ala Gly Leu Lys Leu Asp Gly Thr Gly Lys Lys Ala Asn Ile Leu
145 150 155 160

Val Thr Ala Ala Ser Gly Gly Val Gly His Tyr Ala Val Gln Leu Ala
165 170 175

Lys Leu Ala Asn Ala His Val Thr Ala Thr Cys Gly Ala Arg Asn Ile
180 185 190

Glu Phe Val Lys Ser Leu Gly Ala Asp Glu Val Leu Asp Tyr Lys Thr
195 200 205

Pro Glu Gly Ala Ala Leu Lys Ser Pro Ser Gly Lys Lys Tyr Asp Ala
210 215 220

Val Val His Cys Ala Asn Gly Ile Pro Phe Ser Val Phe Glu Pro Asn
225 230 235 240

Leu Ser Glu Asn Gly Lys Val Ile Asp Ile Thr Pro Gly Pro Asn Ala
245 250 255

Met Trp Thr Tyr Ala Val Lys Lys Ile Thr Met Ser Lys Lys Gln Leu
260 265 270

Val Pro Leu Leu Leu Ile Pro Lys Ala Glu Asn Leu Glu Phe Met Val
275 280 285

Asn Leu Val Lys Glu Gly Lys Val Lys Thr Val Ile Asp Ser Lys His
290 295 300

Pro Leu Ser Lys Ala Glu Asp Ala Trp Ala Lys Ser Ile Asp Gly His
305 310 315 320

Ala Thr Gly Lys Ile Ile Val Glu Pro
325

<210> 2

<211> 1228

<212> DNA

<213> Spinacia oleracea

<400> 2

ccatcctaatacgcactcactatagggctcgagcgccgcccgggcaggtc aaactgtggt 60

aagataatac agtaccatta ccatctgacg cgaaatggc tgctaagcta atgcatgcga 120

ttcaatattc tggctatggt ggtggaactg atgctttaaa gcatgttgaa gttgctgttc 180

```

ctgatccaaa gtctgatgag ttattgctta aaattgaggc tgcaactttg aaccaattg 240
attggaagat tcagaagggg gtacttcgtc ccctcttacc ccgcaagttc cctactatac 300
ctggaactga tgttgctggg gaggtagtcc aggctggatc tgctgtaaat aggttttaaaa 360
ctggtgacaa agtcgtggcc gtgcttagtc atgctactgg ggggtgacta gctgaatatg 420
ccgtggcgaa ggagaacctg acagttgcta gaccaccaga agtatcagca gcagaagggtg 480
ctgccttacc tgttgctgcc ctcacggctc accaagctct caccagttt gccaacatca 540
agctcgatgg aagtgggtgaa aggaagaaca tattgatcac ggctgcatca ggggggtgtgg 600
gccactatgc ggtccagctg gcaaagctcg ggaacacgca tgtaacagca acatgtggag 660
cccgcaacct agatttcgtg aaaggcttgg gtgccgatga ggttcttgac tacaaaacac 720
ctgaagggggc gtccttgaca agcccgtcag gaaagaaata tgactacgta gtccacgggtg 780
caagcggaat cccttgggcc acctttgagc ccaatttgag tgaagcaggt aaggtaatag 840
atttgactcc tggcccaact gcaatgatga catttgcttg gaaaaagcta acattctcca 900
aaaagcagct ggtgcctctg cttttgatac caaagatccc caactttgaa tatgtttgtga 960
atttggtaaa ggaaaagaag cttaaaacag tcatagactc taaacatccc ttgagtaaag 1020
gtgaagatgc ttggagtagg ataatgggtg gtcatgctac aggggaagatt ataatcgagc 1080
cttgaataga aaatattgat gcagaccgcg tatatatgtc ttgaaggtta caaactttta 1140
agtttatagt acttgagtta tactttccta gttgtaaaca ttcaagtatt tcataatgtt 1200
atactttcct agtttcctcc aaaaaaaaa 1228

```

<210> 3

<211> 329

<212> PRT

<213> Spinacia oleracea

<400> 3

```

Met Ala Ala Lys Leu Met His Ala Ile Gln Tyr Ser Gly Tyr Gly Gly
1           5           10          15

```

```

Gly Thr Asp Ala Leu Lys His Val Glu Val Ala Val Pro Asp Pro Lys
          20          25          30

```

```

Ser Asp Glu Leu Leu Leu Lys Ile Glu Ala Ala Thr Leu Asn Pro Ile
      35           40           45

```

```

Asp Trp Lys Ile Gln Lys Gly Val Leu Arg Pro Leu Leu Pro Arg Lys
50           55           60

```

```

Phe Pro Thr Ile Pro Gly Thr Asp Val Ala Gly Glu Val Val Gln Ala
65           70           75           80

```

Gly Ser Ala Val Asn Arg Phe Lys Thr Gly Asp Lys Val Val Ala Val
 85 90 95
 Leu Ser His Ala Thr Gly Gly Ala Leu Ala Glu Tyr Ala Val Ala Lys
 100 105 110
 Glu Asn Leu Thr Val Ala Arg Pro Pro Glu Val Ser Ala Ala Glu Gly
 115 120 125
 Ala Ala Leu Pro Val Ala Ala Leu Thr Ala His Gln Ala Leu Thr Gln
 130 135 140
 Phe Ala Asn Ile Lys Leu Asp Gly Ser Gly Glu Arg Lys Asn Ile Leu
 145 150 155 160
 Ile Thr Ala Ala Ser Gly Gly Val Gly His Tyr Ala Val Gln Leu Ala
 165 170 175
 Lys Leu Gly Asn Thr His Val Thr Ala Thr Cys Gly Ala Arg Asn Leu
 180 185 190
 Asp Phe Val Lys Gly Leu Gly Ala Asp Glu Val Leu Asp Tyr Lys Thr
 195 200 205
 Pro Glu Gly Ala Ser Leu Thr Ser Pro Ser Gly Lys Lys Tyr Asp Tyr
 210 215 220
 Val Val His Gly Ala Ser Gly Ile Pro Trp Ser Thr Phe Glu Pro Asn
 225 230 235 240
 Leu Ser Glu Ala Gly Lys Val Ile Asp Leu Thr Pro Gly Pro Thr Ala
 245 250 255
 Met Met Thr Phe Ala Trp Lys Lys Leu Thr Phe Ser Lys Lys Gln Leu
 260 265 270
 Val Pro Leu Leu Leu Ile Pro Lys Ile Pro Asn Phe Glu Tyr Val Val
 275 280 285
 Asn Leu Val Lys Glu Lys Lys Leu Lys Thr Val Ile Asp Ser Lys His
 290 295 300
 Pro Leu Ser Lys Gly Glu Asp Ala Trp Ser Arg Ile Met Gly Gly His
 305 310 315 320
 Ala Thr Gly Lys Ile Ile Ile Glu Pro
 325

<210> 4

<211> 41

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 4

Phe Leu Pro Arg Lys Phe Pro Cys Ile Pro Ala Thr Asp Val Ala Gly
 1 5 10 15

Glu Val Val Glu Val Gly Ser Gly Val Lys Asn Phe Lys Ala Gly Asp
 20 25 30

Lys Val Val Ala Val Leu Ser His Leu
 35 40

<210> 5

<211> 41

<212> PRT

<213> Spinacia oleracea

<400> 5

Leu Leu Pro Arg Lys Phe Pro Thr Ile Pro Gly Thr Asp Val Ala Gly
 1 5 10 15

Glu Val Val Gln Ala Gly Ser Ala Val Asn Arg Phe Lys Thr Gly Asp
 20 25 30

Lys Val Val Ala Val Leu Ser His Ala
 35 40

<210> 6

<211> 327

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 6

Met Ala Thr Arg Ile Glu Phe His Lys His Gly Gly Pro Glu Val Leu
 1 5 10 15

Gln Ala Val Glu Phe Thr Pro Ala Asp Pro Ala Glu Asn Glu Ile Gln
 20 25 30

Val Glu Asn Lys Ala Ile Gly Ile Asn Phe Ile Asp Thr Tyr Ile Arg
 35 40 45

Ser Gly Leu Tyr Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Gly Leu Gly Thr Glu
 50 55 60
 Ala Ala Gly Ile Val Ser Lys Val Gly Ser Gly Val Lys His Ile Lys
 65 70 75 80
 Ala Gly Asp Arg Val Tyr Ala Gln Ser Ala Leu Gly Ala Tyr Ser
 85 90 95
 Ser Val His Asn Ile Ile Ala Asp Lys Ala Ala Ile Leu Pro Ala Ala
 100 105 110
 Ile Ser Phe Glu Gln Ala Ala Ala Ser Phe Leu Lys Gly Leu Thr Val
 115 120 125
 Tyr Tyr Leu Leu Arg Lys Thr Tyr Glu Ile Lys Pro Asp Glu Gln Phe
 130 135 140
 Leu Phe His Ala Ala Ala Gly Gly Val Gly Leu Ile Ala Cys Gln Trp
 145 150 155 160
 Ala Lys Ala Leu Gly Ala Lys Leu Ile Gly Thr Val Gly Thr Ala Gln
 165 170 175
 Lys Ala Gln Ser Ala Leu Lys Ala Gly Ala Trp Gln Val Ile Asn Tyr
 180 185 190
 Arg Glu Glu Asp Leu Val Glu Arg Leu Lys Glu Ile Thr Gly Gly Lys
 195 200 205
 Lys Val Arg Val Val Tyr Asp Ser Val Gly Arg Asp Thr Trp Glu Arg
 210 215 220
 Ser Leu Asp Cys Leu Gln Arg Arg Gly Leu Met Val Ser Phe Gly Asn
 225 230 235 240
 Ser Ser Gly Ala Val Thr Gly Val Asn Leu Gly Ile Leu Asn Gln Lys
 245 250 255
 Gly Ser Leu Tyr Val Thr Arg Pro Ser Leu Gln Gly Tyr Ile Thr Thr
 260 265 270
 Arg Glu Glu Leu Thr Glu Ala Ser Asn Glu Leu Phe Ser Leu Ile Ala
 275 280 285
 Ser Gly Val Ile Lys Val Asp Val Ala Glu Gln Gln Lys Tyr Pro Leu
 290 295 300
 Lys Asp Ala Gln Arg Ala His Glu Ile Leu Glu Ser Arg Ala Thr Gln
 305 310 315 320

Gly Ser Ser Leu Leu Ile Pro
325

<210> 7

<211> 334

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 7

Met Lys Cys Thr Ile Pro Glu Gln Gln Lys Val Ile Leu Ile Asp Glu
1 5 10 15

Ile Gly Gly Tyr Asp Val Ile Lys Tyr Glu Asp Tyr Pro Val Pro Ser
20 25 30

Ile Ser Glu Glu Glu Leu Leu Ile Lys Asn Lys Tyr Thr Gly Val Asn
35 40 45

Tyr Ile Glu Ser Tyr Phe Arg Lys Gly Ile Tyr Pro Cys Glu Lys Pro
50 55 60

Tyr Val Leu Gly Arg Glu Ala Ser Gly Thr Val Val Ala Lys Gly Lys
65 70 75 80

Gly Val Thr Asn Phe Glu Val Gly Asp Gln Val Ala Tyr Ile Ser Asn
85 90 95

Ser Thr Phe Ala Gln Tyr Ser Lys Ile Ser Ser Gln Gly Pro Val Met
100 105 110

Lys Leu Pro Lys Gly Thr Ser Asp Glu Glu Leu Lys Leu Tyr Ala Ala
115 120 125

Gly Leu Leu Gln Val Leu Thr Ala Leu Ser Phe Thr Asn Glu Ala Tyr
130 135 140

His Val Lys Lys Gly Asp Tyr Val Leu Leu Phe Ala Ala Ala Gly Gly
145 150 155 160

Val Gly Leu Ile Leu Asn Gln Leu Leu Lys Met Lys Gly Ala His Thr
165 170 175

Ile Ala Val Ala Ser Thr Asp Glu Lys Leu Lys Ile Ala Lys Glu Tyr
180 185 190

Gly Ala Glu Tyr Leu Ile Asn Ala Ser Lys Glu Asp Ile Leu Arg Gln
195 200 205

Val Leu Lys Phe Thr Asn Gly Lys Gly Val Asp Ala Ser Phe Asp Ser
210 215 220

Val Gly Lys Asp Thr Phe Glu Ile Ser Leu Ala Ala Leu Lys Arg Lys
225 230 235 240

Gly Val Phe Val Ser Phe Gly Asn Ala Ser Gly Leu Ile Pro Pro Phe
245 250 255

Ser Ile Thr Arg Leu Ser Pro Lys Asn Ile Thr Leu Val Arg Pro Gln
260 265 270

Leu Tyr Gly Tyr Ile Ala Asp Pro Glu Glu Trp Lys Tyr Tyr Ser Asp
275 280 285

Glu Phe Phe Gly Leu Val Asn Ser Lys Lys Leu Asn Ile Lys Ile Tyr
290 295 300

Lys Thr Tyr Pro Leu Arg Asp Tyr Arg Thr Ala Ala Ala Asp Ile Glu
305 310 315 320

Ser Arg Lys Thr Val Gly Lys Leu Val Leu Glu Ile Pro Gln
325 330

<210> 8

<211> 329

<212> PRT

<213> Cavia porcellus

<400> 8

Met Ala Thr Gly Gln Lys Leu Met Arg Ala Ile Arg Val Phe Glu Phe
1 5 10 15

Gly Gly Pro Glu Val Leu Lys Val Gln Ser Asp Val Ala Val Pro Ile
20 25 30

Pro Lys Asp His Gln Val Leu Ile Lys Val His Ala Cys Gly Ile Asn
35 40 45

Pro Val Glu Thr Tyr Ile Arg Ser Gly Thr Tyr Thr Arg Ile Pro Leu
50 55 60

Leu Pro Tyr Thr Pro Gly Thr Asp Val Ala Gly Val Val Glu Ser Ile
65 70 75 80

Gly Asn Asp Val Ser Ala Phe Lys Lys Gly Asp Arg Val Phe Thr Thr
85 90 95

Ser Thr Ile Ser Gly Gly Tyr Ala Glu Tyr Ala Leu Ala Ser Asp His
 100 105 110
 Thr Val Tyr Arg Leu Pro Glu Lys Leu Asp Phe Arg Gln Gly Ala Ala
 115 120 125
 Ile Gly Ile Pro Tyr Phe Thr Ala Cys Arg Ala Leu Phe His Ser Ala
 130 135 140
 Arg Ala Lys Ala Gly Glu Ser Val Leu Val His Gly Ala Ser Gly Gly
 145 150 155 160
 Val Gly Leu Ala Ala Cys Gln Ile Ala Arg Ala Tyr Gly Leu Lys Val
 165 170 175
 Leu Gly Thr Ala Gly Thr Glu Glu Gly Gln Lys Val Val Leu Gln Asn
 180 185 190
 Gly Ala His Glu Val Phe Asn His Arg Asp Ala His Tyr Ile Asp Glu
 195 200 205
 Ile Lys Lys Ser Ile Gly Glu Lys Gly Val Asp Val Ile Ile Glu Met
 210 215 220
 Leu Ala Asn Val Asn Leu Ser Asn Asp Leu Lys Leu Leu Ser Cys Gly
 225 230 235 240
 Gly Arg Val Ile Ile Val Gly Cys Arg Gly Ser Ile Glu Ile Asn Pro
 245 250 255
 Arg Asp Thr Met Ala Lys Glu Ser Thr Ile Ser Gly Val Ser Leu Phe
 260 265 270
 Ser Ser Thr Lys Glu Glu Phe Gln Gln Phe Ala Ser Thr Ile Gln Ala
 275 280 285
 Gly Met Glu Leu Gly Trp Val Lys Pro Val Ile Gly Ser Gln Tyr Pro
 290 295 300
 Leu Glu Lys Ala Ser Gln Ala His Glu Asn Ile Ile His Ser Ser Gly
 305 310 315 320
 Thr Val Gly Lys Thr Val Leu Leu Met
 325

<210> 9

<211> 331

<212> PRT

<213> Mus musculus

1516s7.ST25

<400> 9

Met Ala Thr Gly Gln Lys Leu Met Arg Ala Ile Arg Val Phe Glu Phe
1 5 10 15
Gly Gly Pro Glu Val Leu Lys Leu Gln Ser Asp Val Val Val Pro Val
20 25 30
Pro Gln Ser His Gln Val Leu Ile Lys Val His Ala Cys Gly Val Asn
35 40 45
Pro Val Glu Thr Tyr Ile Arg Ser Gly Ala Tyr Ser Arg Lys Pro Ala
50 55 60
Leu Pro Tyr Thr Pro Gly Ser Asp Val Ala Gly Ile Ile Glu Ser Val
65 70 75 80
Gly Asp Lys Val Ser Ala Phe Lys Lys Gly Asp Arg Val Phe Cys Tyr
85 90 95
Ser Thr Val Ser Gly Gly Tyr Ala Glu Phe Ala Leu Ala Ala Asp Asp
100 105 110
Thr Ile Tyr Pro Leu Pro Glu Thr Leu Asn Phe Arg Gln Gly Ala Ala
115 120 125
Leu Gly Ile Pro Tyr Phe Thr Ala Cys Arg Ala Leu Phe His Ser Ala
130 135 140
Arg Ala Arg Ala Gly Glu Ser Val Leu Val His Gly Ala Ser Gly Gly
145 150 155 160
Val Gly Leu Ala Thr Cys Gln Ile Ala Arg Ala His Gly Leu Lys Val
165 170 175
Leu Gly Thr Ala Gly Ser Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Leu Gln Asn
180 185 190
Gly Ala His Glu Val Phe Asn His Lys Glu Ala Asn Tyr Ile Asp Lys
195 200 205
Ile Lys Met Ser Val Gly Asp Lys Asp Lys Gly Val Asp Val Ile Ile
210 215 220
Glu Met Leu Ala Asn Glu Asn Leu Ser Asn Asp Leu Lys Leu Leu Ser
225 230 235 240
His Gly Gly Arg Val Val Val Val Gly Cys Arg Gly Pro Ile Glu Ile
245 250 255

Asn Pro Arg Asp Thr Met Ala Lys Glu Thr Ser Ile Ile Gly Val Ser
 260 265 270

Leu Ser Ser Ser Thr Lys Glu Glu Phe Gln Gln Phe Ala Gly Leu Leu
 275 280 285

Gln Ala Gly Ile Glu Lys Gly Trp Val Lys Pro Val Ile Gly Ser Glu
 290 295 300

Tyr Pro Leu Glu Lys Ala Ala Gln Ala His Glu Asp Ile Ile His Gly
 305 310 315 320

Ser Gly Lys Thr Gly Lys Met Ile Leu Leu Leu
 325 330

<210> 10

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 10
 tcacatatgg ctggaaaact caatgcac

28

<210> 11

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 11
 atggatccaa cgctcttatg gctcgac

27

<210> 12

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 12

cctctcgaga tggctggaaa actcatgcac

30

<210> 13

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 13

caacccatgg atggctcgac aatgatcttc

30

<210> 14

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 14

cggttgatcga catgaagagt aatgaggttt gcctg

35

<210> 15

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 15

gaatggatcga catgtttctg ccccgcaagt tc

32

<210> 16

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 16

ggttgtcgac atgctaggtg gaggtggact tg

32

<210> 17

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 17

cctctcgaga tggctggaaa aactcatgca c

31

<210> 18

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 18

acccatggct agatggctaa gaaccgctac

30

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1.../3...

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 @ W / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif)		MJPbv1516/7FR
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		02 07729
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)		
PEPTIDE D'ADRESSAGE PLASTIDIAL		
LE(S) DEMANDEUR(S) :		
GENOPLANTE-VALOR 93, rue Henri Rochefort 91025 EVRY CEDEX		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :		
1	Nom	MIRAS
	Prénoms	Stéphane
Adresse	Rue	70 Ter, Avenue Aristide Bergès
	Code postal et ville	93 181 910 LANCEY
Société d'appartenance (facultatif)		
2	Nom	SALVI
	Prénoms	Daniel
Adresse	Rue	Le Manguely
	Code postal et ville	93 182 110 TULLINS
Société d'appartenance (facultatif)		
3	Nom	ROLLAND
	Prénoms	Norbert
Adresse	Rue	7 rue Victor Hugo
	Code postal et ville	93 181 120 SAINT-EGREVE
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		
Paris, le 13 juin 2003 VIALLE-PRESLES Marie José (n° 93-2009)		

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2. / 3..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

INV

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 113 0 W / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif)	MJPbv1516/7FR
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL	02 07729

TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

PEPTIDE D'ADRESSAGE PLASTIDIAL

LE(S) DEMANDEUR(S) :

GENOPLANTE-VALOR

93, rue Henri Rochefort

91025 EVRY CEDEX

DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :

<input checked="" type="checkbox"/> 1	Nom	JOYARD
	Prénoms	Jacques
Adresse	Rue	10 allée de la Piat
	Code postal et ville	13 18 214 10 MEYLAN
Société d'appartenance (facultatif)		
<input checked="" type="checkbox"/> 2	Nom	FERRO
	Prénoms	Myriam
Adresse	Rue	116 rue Charles Michels
	Code postal et ville	13 18 16 10 10 FONTAINE
Société d'appartenance (facultatif)		
<input checked="" type="checkbox"/> 3	Nom	GARIN
	Prénoms	Jérôme
Adresse	Rue	6 clos de la Providence
	Code postal et ville	13 18 17 10 10 CORENC
Société d'appartenance (facultatif)		

S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.

DATE ET SIGNATURE(S)

DU (DES) DEMANDEUR(S)

OU DU MANDATAIRE

(Nom et qualité du signataire)

Paris, le 13 juin 2003

VIALLE-PRESLES Marie José

(n° 93-2009)

Marie José Vialle-Presles

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 3../3..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 @ W / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif)		MJPbv1516/7FR
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		02 07729
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)		
PEPTIDE D'ADRESSAGE PLASTIDIAL		
LE(S) DEMANDEUR(S) :		
GENOPLANTE-VALOR 93, rue Henri Rochefort 91025 EVRY CEDEX		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :		
1	Nom	GRUNWALD
	Prénoms	Didier
Adresse	Rue	3 rue des Brioux
	Code postal et ville	1318120 SAINT-EGREVE
Société d'appartenance (facultatif)		
2	Nom	
	Prénoms	
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
3	Nom	
	Prénoms	
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		
Paris, le 13 juin 2003 VIALLE-PRESLES Marie José (n° 93-2009)		

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.